

SPEZIFITÄTSUNTERSUCHUNG AN
DENATURIERTEN MUSKELPROTEINEN MITTELS
SDS-PAG-GRADIENTEN-ELEKTROPHORESE

MICHAEL SCHRÖTER

1985

*Liss
München*

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Spann

Spezifitätsuntersuchung an
denaturierten Muskelproteinen
mittels SDS-PAG-Gradienten-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Michael Schröter
aus München

Jahr 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 19. Dezember 1985

Herrn Prof. Dr. W. Spann danke ich für die Genehmigung des Themas.

Frau Dr. C. Baur gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Für Anregungen, Demonstration von Labortechniken und Hilfe zur Lösung technischer Probleme danke ich den Mitarbeitern am Institut für Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München in Weihenstephan, A. Görg, W. Postel, J. Weser und R. Westermeier.

Den Angehörigen des Instituts für Rechts-Medizin der Universität München sei gedankt für ihre Kooperation und Geduld im Sektionssaal sowie in den Laboratorien.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

GLIEDERUNG

Seite

A. EINLEITUNG	1
B. BIOCHEMIE DER MUSKELPROTEINE	3
1. Fleisch und Muskel	3
2. Struktur und Eigenschaften der Proteine	3
3. Aufbau des kontraktile Systems	6
4. Bindegewebe	7
5. Muskelproteine	8
a. sarkoplasmatische Proteine	8
b. myofibrilläre Proteine	8
c. Bindegewebsproteine	9
C. PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE EINFLÜSSE AUF DAS MUSKELGEWEBE	10
1. Denaturierung von Proteinen (Definitionen)	10
2. Hitzedenaturierung der Muskelproteine	11
3. Hitzereaktionen der Sulfhydrylgruppen	13
4. Wirkung der proteolytischen Enzyme des gastro-intestinalen Systems	13
D. THEORIE DER ULTRADÜNNESCHICHT-SDS-PAGE-ELEKTROPHORESE MIT KONTINUIERLICH-EXPONENTIELL-KONKAVEM GRADIENTEN	15
1. SDS-Wirkung auf Proteine	15
2. Das Polyacrylamidgel	16
3. Kontinuierliche Gradientengele	19
a. Das Gradientenmischgerät	19
b. Theorie der kontinuierlichen Gradientengele	20
4. Ultradünnschicht-PAGE-Elektrophorese	22

E. TECHNIK DER ULTRADÜNNESCHICHT-SDS-PAGE- ELEKTROPHORESE MIT KONTINUIERLICH- EXPONENTIELL-KONKAVEM GRADIENTEN	24
1. a. Apparate und Ausrüstung	24
b. Materialien	24
c. Chemikalien	24
d. Lösungen	25
2. a. Gradientenengel-Gießtechnik	27
b. Gellösungen	29
c. Arbeitsgänge	29
3. a. Vorbereitung der Elektrophoresekammer	31
b. Arbeitsgänge	31
c. Visualisierung	33
d. Dokumentation	33
e. Molekulargewichtsbestimmung	33
f. Markerproteinklösung	35
4. Probenbereitung	36
a. Probenentnahme	36
b. Homogenisierung und Inkubation	36
c. Acetonbehandlung	36
d. Dialyse	37
e. Filtration	37
f. 1. Empirische Bestimmung der geeigneten Proteinkonzentration	37
2. Rechnerische Bestimmung der geeigneten Proteinkonzentration	37
g. Inkubation mit β -Mercaptoäthanol	39
5. Charakteristika der verwendeten Proben (Tabelle)	40
Appendix:	
a. Gesamtproteinbestimmung nach LOWRY	42
b. Troubleshooting-Guide	44

Seite

F. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

46

G. ZUSAMMENFASSUNG

56

Literaturverzeichnis

57

ABBILDUNGEN

	Seite
1. Schematischer Aufbau des Gradientenmischgerätes	20
2. Graphische Darstellung der Acrylamidkonzentration im Verhältnis zum Küvettenfüllungsvolumen	21
3. Schematischer Aufbau der Polymerisations-Küvette	28
4. Schematischer Aufbau der Elektrophorese-Kammer	32
5. Fickkurve zur Ermittlung der Molekulargewichte	34
6. Elektrophorese XIX	47
7. Schema	48
8. Elektrophorese XVIII	51

A. EINLEITUNG

In ausgewählten Fällen der Rechtsmedizin, wie auch in der Lebensmittelchemie, besteht ein reges Interesse, Proteine zu analysieren und deren artspezifische Herkunft zu belegen. Auf die Frage nach einer Artspezifizierung denaturierter, aus dem Mageninhalt Verstorbener asservierter Fleischbestandteile, konnte bisher kein laborchemisches Verfahren befriedigende Ergebnisse liefern, die insbesondere auch den Ansprüchen der forensischen Medizin genügen würden.

Die sonst sehr aussagekräftigen und relativ einfachen Routinetechniken setzen meist ein intaktes (= natives) Proteinmolekül voraus, das aufgrund seines Molekulargewichtes, der sterischen Anordnung seiner Untereinheiten oder spezifischer Oberflächendeterminanten identifiziert werden kann. Gerade diese Eigenschaften aber werden durch die Denaturierung verändert oder zerstört und lassen von Techniken, die eine Integrität der Tertiär- bzw. Quartärstruktur voraussetzen, keine verwertbaren Resultate erwarten.

Die zum Beispiel bei der Hitzedenaturierung auftretenden Molekülveränderungen folgen einer statistischen Zufallsverteilung und gewähren ein - gemäß der Definition der Denaturierung - nur auf der Ebene der Aminosäuresequenzen integeres Proteinmolekül.

Die anhand sequenzanalytischer Verfahren erstellten Atlanten einiger spezieller Proteingruppen lassen die evolutionsbedingten Speziesunterschiede erkennen; sie beruhen meist nur auf dem Austausch einiger weniger Aminosäuren im sonst stereotyp-gleichen Aufbau z. B. der Proteine des kontraktilen Systems.

Eine Identifizierung der einzelnen Spezies wird im Verband mehrerer Muskelproteine und deren charakteristischen Elektrophoresemuster angestrebt.

Bei der Suche nach einem geeigneten Verfahren bot sich die SDS-Elektrophoresetechnik an, insbesondere durch die ermutigenden Ergebnisse, die mit dieser Technik bei Untersuchungen an Leguminoseproteinen erzielt werden konnten.

Da das Detergenz, Na-Dodecylsulfat, die Denaturierung (Zerstörung oder Neubildung von inter- und intrachain S-S-Bindungen) begünstigt und zu einer Auffaltung der Aminosäureketten beiträgt (also eine zufällig entstandene neue Anordnung von Tertiär- bzw. Quartärstruktur auflöst und so die Primärsequenz demaskiert), ließ sich hier ein geeignetes Verfahren vermuten.

Die Ultradünnschicht-Methode mit einem kontinuierlichen Gradienten erweckte die Hoffnung, auch mit den teilweise geringen Probenmengen, die aus dem Sektionsgut gewonnen werden konnten, noch verwertbare Konzentrierungen der Proteinbanden zu erreichen.

B. BIOCHEMIE DER MUSKELPROTEINE

1. Fleisch und Muskel

Unter Fleisch versteht man tierische Muskulatur, die zur Ernährung des Menschen dient. Praktische Bedeutung erlangt diese Definition lediglich gegenüber ebenfalls der Ernährung des Menschen dienenden tierischen Innereien (LAWRIE).

Mageres Fleisch besteht aus ca. 75 % Wasser, 20 % Protein, 3 % Fett und 2 % stickstofffreien, löslichen Substanzen. Neben den Proteinen des kontraktile Systems enthält Fleisch auch Proteine des Bindegewebes, des Gefäß- und Reizleitungssystems u. a., so daß qualitativ ein heterogener Komplex von Gewebsproteinen vorliegt. Quantitativ jedoch überwiegt das in sich wieder heterologe Gemisch der Muskelproteine. Da die 20 % Protein über den Stickstoffgehalt hochgerechnet werden, sind auch 1 bis 1,5 % nicht proteingebundene, stickstoffhaltige Substanzen wie Aminosäuren, Nukleotide, Kreatinin und anderes enthalten. Stickstofffreie Substanzen sind Kohlenhydrate (Glykogen, Glukose, Glukose-6-Phosphat und Milchsäure) und Minerale (Phosphor, Kalzium, Kalium, Magnesium, Zink, Eisen, Natrium und Spurenelemente) (SCHUT).

2. Struktur und Eigenschaften der Proteine

Nach KARLSON sind Proteine komplexe Moleküle mit hohem Molekulargewicht, die aus ca. 20 verschiedenen Alpha-Aminosäuren in Peptidbindung (- NH-CO -) aufgebaut sind. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften eines Proteins werden in erster Linie von den Seitenketten der Aminosäuren und ihrer Reihenfolge (= Sequenz oder Primärstruktur) im Molekül getragen. Mit Ausnahme der Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin sind alle Aminosäuren L-konfiguriert, was sich in der sterischen Anordnung der Proteinmole-

küle (= Sekundärstruktur) äußert. Für viele Proteine wird eine Alpha-Helix-Konformation nach WATSON und CRICK angenommen. Die Alpha-Helixanordnung wird durch sogenannte Wasserstoffbrücken begünstigt (darunter versteht man die schwache Wechselwirkung, die mit Sauerstoff oder Stickstoff kovalent gebundene Wasserstoffatome mit anderen Sauerstoff- bzw. Stickstoffatomen eingehen). In den Proteinen bildet die Wechselwirkung von $\text{NH}\cdots\text{O}$ die wichtigste dieser Brückenbindungen. Die in den Muskelproteinen vorherrschende Alpha-Helix-Konfiguration wird dadurch stabilisiert, daß jede Aminosäure mit jeder vierten über eine Wasserstoffbrücke verbunden ist.

Größere Bedeutung für die Eigenschaften der Proteine haben jedoch die kovalenten Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten, die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Glycin, Leucin, Isoleucin, Valin etc., und die Salzbrücken, die zwischen Aminosäuren gegensätzlicher Ladungen entstehen. Diese Bindungsarten bedingen die Faltung der Helix zur endgültigen Proteinkonfiguration (= Tertiärstruktur).

Besonderes Interesse gilt den geladenen Gruppen, da sie auf Änderungen von pH und Ionenkonzentration besonders empfindlich reagieren. Die Ladung der Proteinmoleküle rührt von den negativ geladenen Carboxylgruppen her, die Aminosäuren wie Asparaginsäure und Glutaminsäure tragen und den positiven Ladungen der Aminogruppen, der Aminosäuren Arginin, Lysin und Hystidin. Diese Ladung tragenden Gruppen befinden sich normalerweise in einem Ionisationsgleichgewicht. Somit ist die Ladung des Proteinmoleküls eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration. Bei sehr niedrigem pH ist das Proteinmolekül ausschließlich positiv geladen. Zwischen pH 3 und 5,5 erhalten die Carboxylgruppen zunehmend negativere Ladungen. Bei pH 5,5 bis 7 verliert Hystidin seine positive Ladung; ein Effekt, der bei Lysin und Arginin eines pH von über 9 bedarf. Bei sehr hohem pH ist das Proteinmolekül dann ausschließlich negativ geladen.

Über einen weiteren pH-Bereich verhalten sich die positiven und negativen Ladungen neutral, bedingt durch sogenannte Salzbrücken, die durch elektrostatische Kräfte zustande kommen. Die rigide Struktur des Proteinmoleküls erlaubt nur einem Teil der Ladungen, sich so zu neutralisieren, während andere dadurch voneinander ferngehalten werden. Diese anderen Ladungen können durch freie Ladungen anderer Moleküle gebunden werden.

Zu trennen sind die Begriffe freie Ladung, effektive Ladung und Nettoladung. Als Nettoladung bezeichnet man die arithmetische Summe positiver und negativer Ladungen. Der pH-Wert, bei dem die Nettoladung gleich Null ist, wird isoelektrischer Punkt (IP) genannt.

Obwohl die Nettoladung am IP null ist, kann die effektive Ladung, d. h. die Summe der Absolutwerte positiver und negativer freier Ladungen, beachtlich sein und es ist weitgehend die effektive Ladung, die die Eigenschaften des Proteins bezüglich Hydratationsgrad und Löslichkeit bestimmt. Die Differenz zwischen Netto- und Effektivladung nimmt bei Salzbrückenbildung ab. Wird ein Protein durch pH oder Hitze denaturiert, so verliert es die rigide Struktur und eine maximale innere Neutralisation erfolgt; die effektive Ladung wird annähernd gleich der Nettoladung und die Löslichkeit am IP nimmt ab.

3. Aufbau des kontraktile Systems (SILBERNAGEL, SCHMIDT)

Die Grundeinheit aller Muskeln ist die Faser. Muskelfasern sind vielkernige Zellen, die trotz ihres Durchmessers von nur 10 bis 100 μm eine Länge von über 30 cm erreichen können. Jede Faser wird vom Sarkolem (Doppelmembran) umgeben. Jede einzelne Faser ist aus einer Anzahl kleiner longitudinal angeordneter Einheiten, den Myofibrillen zusammengesetzt, die vom Sarkoplasma umgeben sind. Im Sarkoplasma befinden sich Strukturen wie Sarkosomen (Mitochondrien), Fettkörperchen und das tubuläre System (sarkoplasmatisches Retikulum) sowie Ribosomen, Lysosomen und Stärkekörnchen. Die Myofibrillen sind 1 bis 2 μm starke Fasern, die ein halbkristallines, kontraktiles Proteingel bilden, aus dem sich 60 % des Volumens einer Muskelfaser zusammensetzt. Die Proteinkonzentration liegt zwischen 15 und 20 %. Die Querstreifung der Skelettmuskulatur unter dem Mikroskop kommt durch die periodische Anordnung kontraktile Strukturen zustande, deren funktionelle Einheit als Sarkomer bezeichnet wird. Ein Sarkomer enthält als Untereinheiten Aktin- und Myosinfilamente, deren Interaktion für eine Muskelkontraktion notwendig ist. Das Myosinmolekül setzt sich aus einem Kopf (schweres Meromyosin oder HMM) und einem Schwanz unterschiedlicher Länge (leichtes Meromyosin, LMM) zusammen. Ein Bündel dieser Myosinmoleküle bildet ein Myosinfilament, das durch intermolekulare Kräfte der LMM zusammengehalten wird, während die Köpfe (HMM) aus diesem Bündel herausragen und mit den Aktinfilamenten in Verbindung treten.

Filamentäres (F)-Aktin besteht aus zwei verwundenen Alpha-Helices, die aus globulärem (G)-Aktin aufgebaut sind. Die F-Aktinfilamente besitzen keine definierte Moleküllänge.

Ein weiteres kontraktiles Protein dieses Systems aus Aktin und Myosin ist das Tropomyosin, das als Vermittler zwischen den erstgenannten eine wichtige Funktion innehat. Tropomyosin windet sich um das Aktinfilament, wobei ca. alle 40 μm ein Tropomyosinmolekül angeheftet ist. Während der Kontraktion legt sich der Tropomyosinfaden in die Rinne zwischen zwei Aktin-F-Ketten und gibt dabei deren Bindungsstellen für Myosin frei. Als Vermittler wirkt dabei das Ca^{2+} -sensitive Troponin. Troponin (TN) besteht aus drei Untereinheiten: a) TN-C, das die Kalzium²⁺-Bindung eingeht, b) das TN-T, das TN mit Tropomyosin verbindet und c) TN-I, das in Ruhe die Brückenbildung zwischen Myosin und Aktin verhindert. Dieser Hemmeffekt von TN-I wird aufgehoben, wenn TN-C mit Kalzium²⁺ gesättigt ist.

4. Bindegewebe (SCHUT)

Das Epimysium, eine Scheide aus Bindegewebe, umhüllt den gesamten Muskel. Von der Innenfläche des Epimysiums erstrecken sich Bindegewebssepten in den Muskel und unterteilen ihn in Bündel. Diese Septen (das Perimysium) enthalten Nerven und größere Blutgefäße. Vom Perimysium geht ein feines Netzwerk aus, das als Endomysium die einzelnen Muskelfasern umscheidet. Bindegewebe besteht aus geformten Elementen, die in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet sind. Bei den geformten Elementen handelt es sich um elastische, verzweigte Elastinfasern und die unverzweigten, geraden und nicht elastischen Fasern aus Kollagen und Retikulिन. Je nach Gewebe unterscheidet sich die strukturelle Anordnung von einem feinen Netzwerk (z. B. in Knorpel) bis zu dicken Fasern (z. B. Sehne). Die kollagenen Fasern haben Protofibrillen als kleinste Einheiten, die sich zu Filamenten, Fibrillen, einfachen Fasern und zu kollagenen Fasern aneinanderlagern. Anhand des Bindegewebsanteils eines Muskels lassen sich Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen. So ist der Gehalt an Bindegewebe in Muskeln für grobe Bewegungen geringer als in Muskeln, die feinmotorische Aufgaben erfüllen.

5. Muskelproteine (SCHUT)

Muskelproteine in engerem Sinne lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: 1. Sarkoplasmatische Proteine, 2. myofibrilläre Proteine, 3. Bindegewebsproteine.

a) Sarkoplasmatische Proteine (30 % der gesamten Muskelproteine)

In Salzlösungen niedriger Ionenstärke ergibt homogenisiertes Muskelfleisch nach dem Zentrifugieren einen Überstand: das Sarkoplasma. Nach Ultrazentrifugierung setzen sich die strukturierten Elemente ab und man erhält die Sarkoplasmaproteine im Überstand. Es handelt sich um globuläre Proteine, d. h. Proteine, die in Lösungen niedrigen Salzgehaltes löslich sind, in Wasser unlöslich sind und um die wasserlöslichen Albumine, z. B. Myoglobin und die sogenannte Myogenfraktion, zu der die meisten Enzyme der Glykolyse gehören.

b) Myofibrilläre Proteine sind das Myosin, das Aktin, das Aktomyosin und das Tropomyosin-Troponin. Das Myosin (ca. 35 % der gesamten Muskelproteine), ein fadenförmiges Molekül mit einem MG von ca. 510.000, besteht aus HMM und LMM. Myosin enthält in seiner AS-Sequenz einen hohen Anteil an Aspartat und Glutamat und basischen Gruppen wie Histidin, Lysin und Arginin. Bei physiologischem pH kann erwartet werden, daß Myosin ein negativ geladenes Protein darstellt. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,4.

Das Aktin (ca. 15 % der gesamten Muskelproteine) liegt in globulärer Form vor, wenn es mit Wasser aus dem Gewebe extrahiert wird und hat ein MG von 600.000. Unter dem Einfluß

von neutralen Salzen polymerisiert G-Aktin unter ATP-Spaltung zu F-Aktin. Da F-Aktin keine definierte Länge hat, kann auch kein MG angegeben werden.

Aktomyosin, Myosin und F-Aktin liegen im Muskel in einem mehr oder weniger ausgeprägten Komplex, dem Aktomyosin, vor. In Verbindung mit ATP nimmt die Viskosität eines Gemisches aus reinem Aktin und Myosin drastisch ab. Diese Erscheinung wird mit der Dissoziation des Aktomyosins zu Aktin und Myosin erklärt. Gleiche Wirkung wie ATP zeigen auch anorganische Phosphate.

Tropomyosin-Troponin: Natürliches Tropomyosin (MG 56.000) liegt als Komplex aus Tropomyosin und Troponin (MG 80.000) vor. Es hat eine dem Myosin ähnliche AS-Sequenz.

c) **Bindegewebsproteine:**

Kollagen, Elastin und Retikulin

Die Protofibrillen des Kollagens bilden eine Tripelhelix. Ihr Hydroxyprolinegehalt liegt mit ca. 12,8 % höher als bei jedem anderen Muskelprotein. Beim Erhitzen von Kollagen auf 70°C verkürzen sich die Kollagenfasern auf ein Drittel ihrer ursprünglichen Länge. Ab 80°C geht Kollagen zunehmend in Gelatine über. Im Gegensatz zu Kollagen erfolgt bei dem sonst ähnlichen Retikulin keine Umwandlung zu Gelatine beim Erhitzen. Elastin enthält zwei ungewöhnliche AS, das Desmosin und das Isodesmosin, die Kreuzverbindungen zwischen Peptidketten vermitteln und so die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Elastins bedingen. Sein Gehalt an Valin ist viel höher als bei Kollagen; Hydroxyprolin hingegen kommt kaum vor. Elastin ist durch Hitze nicht zu denaturieren und aufgrund der geringen Anzahl ladungstragender Seitenketten ist es extrem säure- und alkaliresistent.

C. PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE EINFLÜSSE AUF DAS MUSKELGEWEBE

Das zum Verzehr vorgesehene Muskelgewebe wird durch verschiedene physikalische und chemische Prozesse verändert. Zu nennen sind hier die physiologischen postmortalen Veränderungen im Elektrolyt- und pH-Bereich, Prozesse im Sinne der Autolyse: der Zeitpunkt der Weiterverarbeitung (Prärigor-, Rigor- und postRigorphase) (BENDALL), die die Zellstruktur zerstörende Wirkung des Einfrierens und Auftauens (LUYET), die thermische Reifung, die Anwendung von Zusatzstoffen verschiedenster Art, Räuchern, Trocknen (TRAUTMANN), bis hin zur Hitzedenaturierung als den gravierendsten Angriff auf die Proteinstruktur.

1. Denaturierung von Proteinen (Definitionen)

Nach KARLSON entspricht die Denaturierung dem Übergang von einem hochgeordneten in einen ungeordneten Zustand, einem "Zufallsknäuel". Dabei kann die Kette verschiedene Anordnungen einnehmen, die statistisch verteilt sind. Es herrscht also eine ungeordnete Struktur vor, das wird u. a. durch die hohe positive Entropieänderung bewiesen. Die Denaturierung ist eine stark endotherme Reaktion - aber sie ist oberhalb einer gewissen kritischen Temperatur dennoch exergonisch. Sie entspricht damit dem Schmelzvorgang und diese Analogie ist nicht nur oberflächlich. Wie beim Schmelzen das Raumgitter des Kristalls zusammenbricht, so werden bei der Denaturierung die Nebervalenzen, die das globuläre Protein in der nativen Konformation stabilisieren, gelöst. Die Proteinkette entfaltet sich (denaturierte Proteine geben das Röntgendiagramm von Beta-Keratin, also einer fast gestreckten Peptidkette) und zwischen den Ketten bilden sich rein zufällig (statistisch) Nebervalenzen aus, wodurch das Protein ausgelöst wird. Andererseits kommen manche Gruppen (z. B. SH-Gruppen oder Tyrosinreste), die vorher im Inneren des Moleküls

verborgen und "maskiert" waren, nach außen und sind reaktionsfähig. Denaturierte Proteine werden durch Proteasen viel leichter angegriffen als native.

NEURATH (1944) definiert die Protein-Denaturierung als jegliche nicht proteolytische Modifikation der ursprünglichen Struktur nativer Proteine, die zu irreversiblen Veränderungen der chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften führt.

KAUZMANN (1956) bezeichnet jeden Prozeß, der diese Sekundär- oder Tertiärstruktur eines Polymers verändert oder zerstört als Denaturierung. (Beispiele für denaturierend wirkende Einflüsse sind: Säure, Alkali, organische Lösungsmittel, konzentrierte Harnstoff- oder Guanidininlösungen, aromatische Säuren wie Salicylsäure und Detergentien wie Dodecylsulfat. Die Empfindlichkeit der Proteine gegenüber diesen Stoffen wie auch gegenüber physikalischen Einflüssen wie Hitze, Strahlung oder Ultraschall ist hier unterschiedlich und hängt zudem von Parametern wie pH, Salzgehalt usw. ab.)

COLVIN (1964) schlägt vor, den Begriff Denaturierung in der Proteinchemie nicht zu gebrauchen, sondern die einzelnen chemischen Vorgänge genau zu beschreiben.

2. Hitzedenaturierung von Muskelgewebe (HAMM)

Nach HAMM kann man den Beginn der Hitzedenaturierung schon bei Temperaturen von 30°C anhand der Verminderung von der ATP-ase-Aktivität bei isolierten Muskelproteinen beobachten. Dabei lassen sich minimale Veränderungen des Myosin-Moleküls feststellen (ENGELHARDT, HASHIMOTO, NANNINGA). Im Muskelgewebe kommt es jedoch, möglicherweise durch den schützenden Einfluß der

Begleitproteine, ihrer hohen Konzentration im Gewebe und ihrer sterischen Anordnung wegen erst zwischen 40° und 60°C zu feststellbaren Veränderungen. Diese Veränderungen myofibrillärer Proteine äußern sich in einer verminderten Kationen- und Wasserbindungskapazität, einer Abnahme der Löslichkeit und der Änderung von pH und IP, was einer Zunahme an verfügbaren Imidazolgruppen zugeschrieben wird. Die ATP-ase-Aktivität erlischt bei 40°C. Bei Temperaturen über 50°C entstehen gegen schwache Säuren stabile Vernetzungen im Protein. Dieser Prozeß kommt weder durch die Formierung neuer Disulfidbrücken - aufgrund von oxydativem Angriff auf Sulfhydrylgruppen - noch durch die Bildung von Salzbrücken zustande, möglicherweise aber durch neu entstandene Wasserstoffbrücken, einer Reaktion von Disulfid- zu Sulfhydrylgruppen und der Verbindung nicht polarer Seitenketten. Die Auffaltung oder Demaskierung der Peptid-Helix ist nicht Voraussetzung für die Koagulation. Besonders im isoelektrischen pH-Bereich (wegen der fehlenden Abstoßung am IP, die das Auffalten der Helix verhindert und die Koagulation fördert), kommt es zu Reaktionen zwischen den Seitenketten innerhalb der Helix. Bei Temperaturen über 70°C scheint die Auffaltung der Proteine vollständig vonstatten gegangen zu sein. Oberhalb von 80°C gehen die SH-Gruppen des Aktomyosins zunehmend in H₂S über. Temperaturen über 90°C führen zum Ausstrom von Kationen (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺) und freiem Orthophosphat (PO₄---). Der Phosphatgehalt des koagulierten Proteins nimmt beim weiteren Erhitzen (90 - 120°C) drastisch ab. Intramuskuläre Proteinasen und Phosphatasen werden bei Temperaturen um 70°C inaktiviert, die Muskel-GOT-Aktivität ist noch bis 80°C nachweisbar.

3. Hitzereaktionen der Sulfhydrylgruppen

Die wichtigste Hauptvalenzbindung zwischen den Seitenketten der Aminosäuren ist die Disulfidbindung, die sich zwischen zwei Cystein-SH-Gruppen ausbildet. Bei allen bekannten Proteinen sind jeweils ganz bestimmte Cysteinreste miteinander verknüpft (BEUTZ, KARLSON). Bis 70°C werden durch die Auffaltung der Proteine Sulfhydrylgruppen in steigendem Maße demaskiert. Zwischen 40°C und 60°C ist die Demaskierung der SH-Gruppen nicht von der Bildung neuer Disulfidbindungen begleitet. Erst ab 70°C setzt die Oxydierung der SH-Gruppen ein. Ebenfalls bei 70°C beginnt nach HAMM die Entwicklung von H₂S, das fast ausschließlich aus den Strukturproteinen der Myofibrillen und nicht aus den wasserlöslichen Proteinen des Sarkoplasmas stammt.

4. Wirkung der proteolytischen Enzyme des GI-Systems

Die Pepsine der Magenmukosa, die bei einem pH-Wert unter 6 aus ihren inaktiven Vorstufen, dem Pepsinogen, durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden, entfalten ihre optimale Wirkung zwischen pH 1,3 - 3 (Pepsin A) und pH 3 - 3,5 (Pepsin C bzw. Gastricin). Eine maximale HCL-Sekretion ergibt einen pH des Magensaftes von etwa 1,0, der durch den Speisebrei auf Werte von etwa pH 2 - 4 abgepuffert wird. Die Spezifität der Pepsine liegt bei Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Phe, Thr oder Leu), jedoch wird auch von weniger spezifischen Proteolysen zwischen Ser-Thr-, Glu-Lys-, Asp- Pro-, Ala-Gly-Bindungen und anderen berichtet. Da die Magenschleimhaut Wasser, Elektrolyte, Mucin, Salzsäure und die proteolytischen Enzyme, wie auch in geringem Maße Lipase sezerniert, beginnt die Verdauung bereits im Magen (FRUTON, MAGEF). Durch die Magensäure werden sowohl der optimale pH-Bereich für Pepsin erreicht, als auch mit der Nahrung aufgenommene unlösliche Salze in löslichere Chloride umgewandelt. Unter anoxischen Bedingungen kommt die HCL-Produktion der Belegzellen zum Erliegen;

Der pH-Wert ändert sich durch die Pufferwirkung des Nahrungsbreies und die Pepsinwirkung erlischt (SILBERNAGEL).

Nach DAVENPORT und UGOLEV wird im Magen Gesunder in Abhängigkeit von Sekretionsmenge, Größe der aufgenommenen Partikel und Magenmotilität nur ein kleiner Anteil der Proteine durch derartige Vorgänge verändert und bestenfalls 10 - 15 % der aufgenommenen Proteine bereits im Magen in Aminosäuren aufgespalten.

Im Mageninhalt Verstorbener finden sich häufig makroskopisch intakt wirkende Fleischstücke, über deren Artspezifität jedoch keine Aussage getroffen werden kann. Solche werden im folgenden Teil dieser Arbeit mittels SDS-PAGE-Elektrophorese in ultradünnen Gelen mit kontinuierlichem konkavem Gradienten untersucht und Vergleiche mit bekannten hitzedenaturierten Fleischproben gezogen.

D. THEORIE DER ULTRADÜNNSCICHT-SDS-PAGE-ELEKTROPHORESE MIT KONTINUIERLICH-EXPONENTIELL-KONKAVEM GRADIENTEN

1. SDS-Wirkung auf Proteine

Mit der SDS-Elektrophorese (Elektrophorese in Anwesenheit von Natrium-dodecyl-sulfat, $C_{12}H_{25}-OSO_3Na$), die erstmals 1967 von SHAPIRO, VINUFLA und MAIZEL beschrieben wurde, lassen sich auch bei Proteinen mit unterschiedlichen Molekülformen die Molekulargewichte bzw. die Molekulargewichte ihrer Untereinheiten bestimmen. Natriumdodecylsulfat denaturiert die Proteine durch Auffaltung des Moleküls und Streckung der einzelnen Polypeptidketten. Da es zu den anionischen Detergenzien gehört, verbindet es sich bei einem pH unterhalb des IP des Proteins mit der Kationengruppe des Proteins und präzipitiert. Pro SDS-Molekül, das an ein Protein gebunden wird, gewinnt dieses eine negative Ladung. Im neutralen pH-Bereich entspricht die Nettoladung des SDS-Proteinkomplexes der Ladung der SDS-Moleküle (OHLENSCHLÄGER, PUTNAM, GLAZER). Die durch SDS aufgefalteten und denaturierten Proteine einer identischen Primärstruktur erhalten eine ähnliche Form und Ladungsdichte. Untersuchungen ergaben, daß die Ladung pro Masseneinheit annähernd konstant ist und daher die elektrophoretische Mobilität des Komplexes in weiten Bereichen eine Funktion des Molekulargewichtes der Proteine darstellt. Dies gilt für Proteine, die SDS gegenüber ein normales Verhalten zeigen. Ausnahmen werden bei Glyko- und Lipoproteinen gefunden, bei Proteinen mit Ladungen im Innern des Moleküls, die nicht vollständig durch SDS denaturiert werden und eine ungewöhnliche Konformation einnehmen (RIGHETTI, WESTERMEIER).

Eine vollständige Dissoziation des Proteins wird durch Zugabe von β -Merkaptoäthanol oder des weniger übelriechenden Dithiotreitol erreicht, das außerdem eine nachträgliche Oxidation der SH-Gruppen und die damit verbundene Oligomerisierung der Polypeptide verhindert.

Die SDS-Elektrophorese eignet sich insbesondere auch zur Auftrennung von denaturierten Proteinen und, weil Natriumdodecylsulfat ein Detergenz ist, von wasser- und pufferunlöslichen Lipoproteinen.

2. Das Polyacrylamidgel

Als Trägersubstanz eignet sich bei der SDS-Elektrophorese besonders das synthetische Polyacrylamidgel (FEHRNSTRÖM, OHLFNSCHLÄGGER, RIGHETTI). Mit Hilfe eines "Crosslinkers" (z.B. BAC = N,N'-bisacrylcystamin, DHFBA = N,N'-(1,2-dihydroxyäthyl)-bisacrylamid oder Bis = N,N'-methylenbisacrylamid) entsteht bei Zimmertemperatur aus dem Monomer Acrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) ein transparentes, farbloses Polyacrylamidgel, das keine polaren Gruppen besitzt, so daß elektroosmotische und adsorptive Effekte vermieden werden. Es ist zudem chemisch äußerst widerstandsfähig und kann von Enzymen nicht angegriffen werden. Die gewünschte Porengröße kann durch Variation der Monomerkonzentrationen und des Vernetzungsgrades in weitem Umfang bestimmt werden. So können zwei verschiedene Trennprinzipien miteinander kombiniert werden: Die elektrophoretische Beweglichkeit als Funktion aus a) der Ladung und b) der Größe der Moleküle.

Da die Moleküle beim Durchwandern eines solchen Molekularsieb-Geles einen Reibungswiderstand erfahren, wird ihre Diffusion eingeschränkt. Die Auflösung der getrennten Fraktionen wird dadurch erheblich verbessert (WESTERMEIER, GÖRG, POSTFL).

Mit der PAG-Elektrophorese lassen sich nicht nur Proben-Heterogenitäten nachweisen und die relativen elektrophoretischen Mobilitäten der einzelnen Fraktionen bestimmen, es gibt auch Möglichkeiten zur näheren Charakterisierung, z. B. eines Proteins.

Läßt man ein Protein in einer Serie von Gelen mit definierten, unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen unter sonst identischen Bedingungen trennen, so ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der relativen Mobilitäten des Proteins und den Konzentrationen der Polyacrylamidgele. Mit diesem von FERGUSSON entwickelten Konzept kann man aus der Steigung der sich in einem halblogarithmischen Koordinatensystem ergebenden Geraden auf die Molekülgröße des Proteins, und aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse (Logarithmus der relativen Mobilität) auf die Nettoladung des Proteins schließen. Auf diese Weise kann man auch feststellen, ob sich verschiedene Proteine in einem Gemisch nur durch ihre Ladung, nur durch ihre Molekülgröße oder durch beides unterscheiden.

Bei der Gradientengel-Elektrophorese, die zum ersten Mal von MARGOLIS und KENRICK beschrieben wurde, wird eine Erhöhung der Auflösung und Bandenschärfe durch den zunehmenden Molekularsiebeffekt eines Porengradienten im Trenngel erreicht. Während des Gießens der Gellösung in die Gelküvette wird mittels eines Gradientenmischers eine konzentrierte Acrylamidlösung kontinuierlich verdünnt, so daß die Acrylamidkonzentration immer weiter abnimmt. Das Gel enthält einen Polyacrylamidgradienten. Mit zunehmender Acrylamidkonzentration nimmt die Porengröße im auspolymerisierten Gel ab. Durch den Porengradienten wird der Molekularsiebeffekt der Gelmatrix erheblich verstärkt; zudem kann ein weites MG-Spektrum optimal aufgetrennt werden. Die Moleküle des Probengemisches wandern im elektrischen Feld soweit in den Porengradienten hinein, bis sie in dem immer enger werdenden Netzwerk, entsprechend ihrer Größe steckenbleiben. Dabei ergeben sich scharf getrennte Fraktionen einheitlicher Molekülgrößen.

Durch Vergleich mit den Fraktionen eines Gemisches von Komponenten bekannter Molekülgrößen, die in der gleichen Matrix mit aufgetrennt werden, lassen sich die Molekülgrößen der Probenkomponenten abschätzen. Bei globulären Proteinen sind die in einem solchen Molekularsieb ermittelten Molekülgrößen den Molekulargewichten äquivalent (die durchschnittliche Porenweite bei 7,5%igen PAGs entspricht 50 Å; bei 30%igen PAGs ca. 20 Å). Das Molekularsieb kann so für Moleküle verschiedenster Größe (MG 10^4 - 10^6) eingestellt werden.

3. Kontinuierliche Gradientengele

a) Das Gradientenmischgerät

Durch den von BRITTEN und ROBERTS 1960 beschriebenen Gradientenmischer gelang es erstmals, kontinuierliche Gradientengele zu gießen.

Das hier verwendete Gradientenmischgerät (Abb. 1) besteht aus zwei - über eine Bohrung im Sockel kommunizierenden - zylindrischen Plexiglaskammern: der Mischkammer (M) und dem Reservoir (R). Mit einem Schieber (1) läßt sich die Verbindung zwischen den beiden Kammern unterbrechen. Zum Gießen von Exponentialgradienten (s. u.) kann die Mischkammer mit einem Gummistöpsel luftdicht verschlossen werden. Dieser Stöpsel enthält ein Ventil (2), über das die beim Einpressen des Stöpsels in das Gefäß verdrängte Luft entweichen und somit Atmosphärendruck in der Mischkammer hergestellt werden kann (dies ist wichtig, da sonst beim Öffnen des Schiebers Flüssigkeit aus dem Misch- in den Vorratsbehälter gepreßt wird).

Außerdem befindet sich am Mischgefäß, ebenfalls am Gefäßboden, eine zweite Bohrung, über die der Gefäßinhalt in einem verschließbaren Polyvinylschlauch (3) zur Polymerisationsküvette abfließen kann. Zur Durchmischung der Flüssigkeiten dient ein Magnetstab, der durch ein externes Rührgerät angetrieben wird.

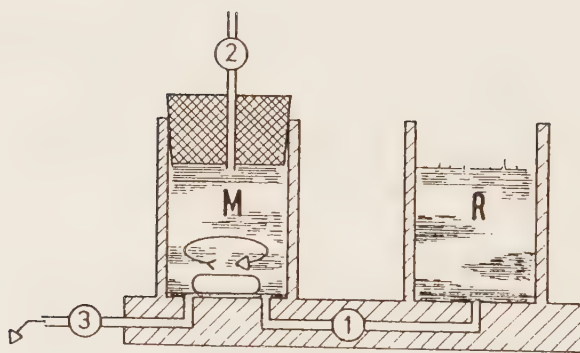


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Gradientenmischgerätes

b) Theorie der kontinuierlichen Gradientengelen (NOLL)

Mit dem oben beschriebenen Gradientenmischer lassen sich durch Variation der Acrylamidkonzentration in Mischkammer und/oder Reservoir, oder durch zusätzliches Konstanthalten des Volumens in der Mischkammer verschiedene Arten von Gelgradienten erzeugen (Abb. 2):

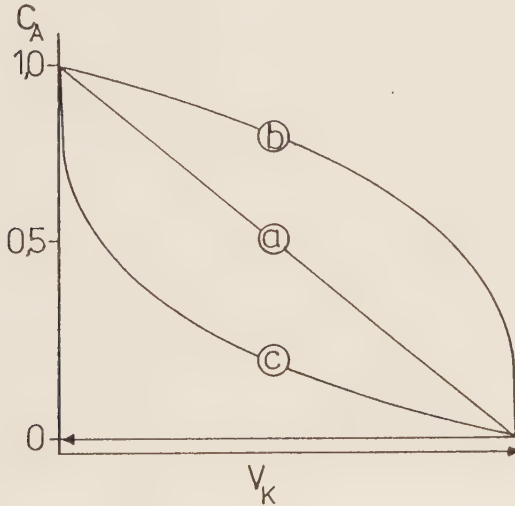


Abb. 2: Graphische Darstellung der Acrylamidkonzentration (C_A) im Verhältnis zum Küvettenfüllungsvolumen (V_K) bei:

- a) linearen Gradientengelen
- b) konvexen Exponentialgradientengelen
- c) konkaven Exponentialgradientengelen

Die Abszisse ist antiparallel, da bei konvexen Gradienten erst die geringer konzentrierte Lösung in die Küvette einströmt (obere Skala), während bei konkaven Gradienten zuerst die höher konzentrierte Acrylamidlösung (untere Skala) in die Küvette strömt.

Alle drei Arten von Gradienten können durch kontinuierliches Einströmen der Acrylamidlösung aus dem Reservoir (Konzentration C_R) in die Mischkammer, die Acrylamid der Konzentration C_V enthält, erzeugt werden, wenn gleichzeitig ein entsprechendes Volumen in die Küvette strömt.

Die Anfangskonzentration in der Mischkammer ändert sich als Funktion des zugeführten Volumens und nähert sich der des Reservoirs ($C_V \rightarrow C_R$). Die Konzentration des Acrylamids in der Mischkammer ändert sich linear als Funktion des Volumens, das aus dem Reservoir zugeführt wird, wenn das Volumen der Mixtur um den entsprechenden Betrag abnimmt.

Wenn im Gegensatz zu den oben beschriebenen Bedingungen für lineare Gradienten das Volumen der Mischkammer während der Prozedur jedoch konstant gehalten wird (durch luftdichten Verschuß der Mischkammer), erhält man einen exponentiellen Gradienten, da mit zunehmender (resp. abnehmender) Konzentration im Mischbehälter jedes sukzessive Nachfließen der stärker (resp. schwächer) konzentrierten Lösung zu einer stärkeren Konzentrationsänderung der Mixtur führt.

4. Ultradünnschicht-PAG-Elektrophorese

Deutlich verbesserte Auflösung und erhöhte Bandenschärfe im Vergleich zur Elektrophorese in 1 - 2 mm dicken PAGs werden durch die von GÖRG, POSTEL und WESTERMEIER eingeführte Ultradünnschicht-Elektrophorese in 120 - 360 μm dicken Gelen, die einer Trägerfolie aufpolymerisiert sind, erreicht. Da bei diesen sehr dünnen Gelen die Probleme der Elektrodendekantation (unter Elektrodendekantation versteht man eine ungleiche Konzentrierung der Proteine und deren Absinken an der Anodenseite der Gelwannen) und der Wärmeabführung kaum eine Rolle spielen, gelang die Rückkehr zur ursprünglichen, weit bequemerem Horizontal-Elektrophorese mit all ihren Vorteilen (der methodische und apparative Aufwand ist für die Horizontaltechnik wesentlich geringer als für die Vertikal-Elektrophorese). Die Proben werden auf einfache Weise in kleine Wannen (Slots) an der Geloberfläche im gewünschten Abstand zur Anode oder Katode einpipettiert. Dadurch ergibt sich zudem der Vorteil, daß sowohl zur Anode als auch zur Katode wandernde Proteine erfaßt werden können - dagegen gehen bei der Vertikalelektrophorese, die in anodischen (bzw. katodischen) Trennsystemen zur Katode (bzw. Anode) wandernden Proteine im Puffertank verloren, da sie nur im oberen Gelende aufgetragen werden können.

Ultradünnschicht-Elektrophoresen können - wegen der gegenüber dicken Gelen effektiveren Wärmeabfuhr - mit bedeutend höheren Feldstärken durchgeführt werden, wodurch sich eine erhebliche Zeitersparnis für die Trennung ergibt. Aufgrund der geringen Diffusionswege in den ultradünnen Gelen ist eine schnelle Fixierung, Anfärbung, Entfärbung und Trocknung (wie bei Zelluloseacetatfolien und Mikroelektrophoresen) möglich.

F. TECHNIK DER ULTRADÜNNESCHICHT-SDS-PAGE-ELEKTROPHORESE MIT KONTINUIERLICH-EXPOSITIVELL-KONKAVEM GRADIENTEN

1. a) Apparate und Ausrüstung:

Multiphor-Grundgerät LKB 2117-301
Horizontal-Elektrophorese-Kit LKB 2117-201
Multiphor-Elektrophorese-Kit LKB 2117-601
Stromversorger LKB 2103
Kryostat LKB 2209-022
Küvettenklemmen ("Bulldog") LKB
Glasplatten 260 x 125 x 3 mm
Gradientenmischer LKB
Sample Application Syringe LKB 2117-214

b) Material:

Parafilm (50 cm breite Rolle (120 µm))
Einmach-Zellophan (Kalle AG, Wiesbaden-Biederich, BRD) oder
Mylar-Polyesterfolie A 23 µ (Du Pont de Nemours, Düsseldorf, BRD)
Elektroden-Paper-Wicks (Whatman 1 (104 x 253 mm))
Kerosin (Fluka 60710)
Dialysenschlauch, Visking (SERVA 44104)
Filterpapier (Whatman Nr. 1)

c) Chemikalien:

Tris (Serva 37190), Glycin (Serva 23390), SDS (Sigma 115750), NaN_3 (Merck 6688), Acrylamid (Serva 10675), N,N' -Methylenbisacrylamid (Serva 29195), TEMED (Serva 35925), Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva 17524), Bromphenolblau (Merck 8122), β -Mercaptoäthanol, Eisessig, 4n HCl, Methanol, Trichloressigsäure, Persulfat (Serva 13375), Glycerin

Markerproteine von Serva:

Cytochrom C (MG 11700) Serva 18020, Pferdemyoglobin (MG 17200) Serva 29895, Gamma-Globulin (MG 23500, MG 50000) Serva 22550, Carboanhydrase (MG 29000) Serva 15880, Ovalbumin (MG 4300) Serva 11840, Humanalbumin (MG 68000) Serva 11885, Humantransferrin (MG 77000) Serva 36765

d) Lösungen:

Elektrodenpuffer:

30,28 g Tris, 144,0 g Glycin, 10,0 g SDS und 0,1 g NaN_3 werden mit H_2O dest. gelöst und auf 1 Liter Lösung gebracht. Zum Gebrauch wird der Elektrodenpuffer 1 : 10 mit H_2O verdünnt.

Gelpuffer pH 8,8 (Lösung A):

181,6 g Tris, 4,0 g SDS und 0,1 g NaN_3 werden in ca. 800 ml H_2O dest. gelöst und nach dem Lösen mit 4 N HCl ein pH von 8,8 eingestellt, dann mit H_2O dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

Probenpuffer:

Zu 10 ml des Gelpuffers (Lösung A) gibt man 1 g SDS (= 1 %) und füllt mit Aqua dest. auf 100 ml auf.

Acrylamidlösung (Lösung B):

14,6 g Acrylamid + 0,4 g Bis (= N,N'-Methylenbisacrylamid) mit 20 % Glycerin/Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen. Filtrieren durch ein Whatman Nr. 1 Filterpapier, wenn die Lösung trübe ist; im Dunkeln bei 4°C aufbewahren. Vorsicht! Das monomere Acrylamid und Bis sind Neurotoxine. Hautkontakte vermeiden und nicht mit dem Mund pipettieren! Vor Gebrauch immer gut mischen.

TEMED-Lösung (Lösung C):

0,060 ml TEMED + 0,140 ml H₂O dest., die Lösung muß immer frisch angesetzt werden.

Ammoniumpersulfat-Lösung (Lösung D):

0,4 g Ammoniumpersulfat mit 1 ml H₂O dest. lösen (40 % Ammoniumpersulfat); die Lösung ist etwa eine Woche haltbar.

Bromphenolblau 4 % (w/v):

25 mg Bromphenolblau auf 10 ml mit Probenpuffer auffüllen.

Detergent zur Plattenreinigung:

0,1 ml Triton x - 100 auf 100 ml H₂O dest.

2. a) Gradientengel-Gießtechnik:

Die Polymerisation der ultradünnen Gele erfolgt in einer Glasküvette, in der Parafilm gleichzeitig als Distanzgeber und Dichtungsstreifen zwischen Grund- und Deckplatte fungiert. Die Grundplatte wird mit Zellophan- oder Polyesterfolie beschichtet. Die Folie dient nach dem Gießen als Träger des Gels. Die Deckplatte trägt die Slotformer, in deren Negativabdrücke im Gel (Slots) später die Proben pipettiert werden. Die Anzahl aufeinandergelegter U-förmiger Parafilm dichtungen determiniert die Geldicke (drei Schichten Parafilm = 360 μm Geldicke). Bei einer dreilagigen Parafilmdichtung mit 5 mm Streifenbreite resultiert bei den verwendeten Plattendimensionen ein Küvettenvolumen von ca. 10,6 ml. Der für die Grundglasplatte der Polymerisationsküvette passend zugeschnittene Zellophanbogen (2 - 3 cm Folienüberstand ringsum) wird ca. 2 min. in destilliertem Wasser eingeweicht und nass, mit Hilfe einer Handgummiwalze blasenfrei auf die Glasplatte aufgezogen. Die Folienüberstände werden auf die Unterseite der Glasplatte umgefaltet und fixiert. Die beschichtete Platte wird an der Luft oder mit dem Fön getrocknet.

Auf einer zweiten Glasplatte (= Deckglasplatte) werden aus Tesafilm (100 μm) sogenannte Slotformer geschnitten. Hierzu werden im Abstand von ca. 1,5 cm parallel zur Glasplattenlängsseite 2 Streifen Tesafilm übereinandergeklebt (entspricht 200 μm) und mit dem Skalpell zu 24 kleinen Blöcken (8 x 2 x 0,2 mm) mit 2 mm Zwischenraum geschnitten. Um ein Haftenbleiben des Gels zu verhindern, wird diese Glasplatte anschließend mit Repel-Silan, Siliconentschäumer oder einem Gemisch aus Gelpuffer, Glycerin und H_2O beschichtet. Nun wird auf die mit Folie beschichtete Seite der Grundglasplatte die U-förmige, dreilagige Parafilmdichtung gelegt und mit der Deckplatte zur Küvette zusammengefügt. (Kommen Gradientengele zur Anwendung, so ist zu bedenken, daß die Proben von der großporigen zur feinporigen Seite des Molekularsiebes wandern sollen - die Slots also in grobmäschigen Anteil (= hoher Anteil "leichter Lösung") liegen

müssen.) Mit Hilfe von Bulldog-Klemmen wird die Küvette zum Gießen zusammengehalten. Die Polymerisationsküvette wird so zusammengebaut, daß sich die Proben-Gelwannen in der oberen Hälfte (ca. 2,5 mm unterhalb des oberen Küvettenrandes) befinden. Die Anordnung der Polymerisationsküvette und des Gradientenmischers sind in Abb. 3 schematisch dargestellt. Die Abstandhalter (Büroklammern) sind zwischen den Oberkanten der Küvetten eingeklemmt. Der Höhenunterschied zwischen dem Boden des Gradientenmischers und der Oberkante der Küvette soll 5 cm betragen. Die Küvette soll vor dem Gießen im Kühlschrank auf ca. 4°C abgekühlt werden, um den Start der Polymerisation zu verzögern. Der Verbindungshahn (1) und die Auslaßklemme (2) des Gradientenmischers sind geschlossen, die Spitze des Auslaßschlauches (4) in der Mitte zwischen den Küvettenoberkanten aufgesetzt. Das Küvettenvolumen beträgt ca. 10,6 ml.

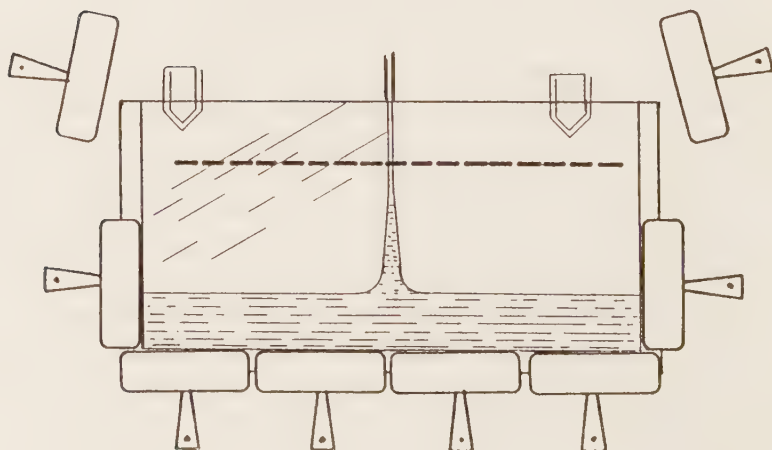


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Polymerisationsküvette

b) Gellösungen:

Leichte Lösung:

2,5 ml Gelpuffer, 7,5 ml H₂O dest., 10 µl Ammoniumpersulfatlösung und 10 µl TEMED-Lösung mischen und entlüften (Wasserstrahlpumpe 2 min).

Schwere Lösung:

Zu 2,5 ml Gelpuffer und 7,5 ml Acrylamidlösung werden nun 10 µl Persulfatlösung und 10 µl TEMED-Lösung pipettiert, gemischt, entlüftet und zügig (!) in die Mischkammer (7,5 ml) und Küvette (1 ml) gefüllt.

c) Arbeitsgänge

1. 7,5 ml "leichte" Lösung in Reservoir (R) des gekühlten (!) Gradientenmischers pipettieren (bei geschl. Ventil 1).
2. "Leichte" Lösung bis zur Mischkammer (M) vorlaufen lassen und Schiebeventil (1) schließen.
3. 7,5 ml "schwere" Lösung in Mischkammer pipettieren (bei geschl. Ventil 3).
4. 1 ml "schwere" Lösung in die Küvette pipettieren.
5. In die Mischkammer einen Magnetrührstab geben. Die Mischkammer mit einem mit geöffnetem Ventil (2) versehenen Stöpsel verschließen. Danach das Ventil am Stöpsel schließen und den Magnetrührer einschalten.
6. Auslaßklemme (3) öffnen und Polyvinylschlauch in Küvettenöffnung halten.
7. Verbindungshahn (1) öffnen.
8. Bei entleertem Reservoir Schieber (1) schließen (um ein Ansaugen von Luft zu verhindern). Öffnen des Ventils am Gummistöpsel.

9. Wenn der Flüssigkeitsspiegel ca. 5 mm unterhalb der Slotreihe liegt: Ohne Unterbrechung des Gießvorgangs vorsichtig Spatel neben Auslaßschlauchspritze einführen, Abstandhalter (Büroklammern) herausziehen, Spatel vorsichtig herausziehen, die beiden oberen Seitenklammern anbringen.
10. 15 min. bei Zimmertemperatur stehenlassen.
11. 30 min. auspolymerisieren bei 50°C (Trockenschrank).

3. a) Vorbereitung der Elektrophoresekammer: (Abb. 4)

Elektroden-Stamm-puffer (pH = 8,8) 30,28 g Tris + 144 g Glycin + 10 g SDS + 0,1 NaN₃ mit H₂O auf 1000 ml.

Flektrodenpuffer: Elektroden-Stamm-puffer mit H₂O im Verhältnis 1 : 10 verdünnen. Je 1000 ml Flektrodenpuffer werden in die beiden Pufferbehälter der Multiphorkammer gefüllt und je 8 Blatt Flektrodenbrückenpapier (Dochte) mit Flektrodenpuffer getränkt. Zur Reinigung der Flektroden-Papierdochte werden weitere 5 Blatt des Papiers mit Flektrodenpuffer getränkt, auf den Kühlblock gelegt, und für ca. 90 min. eine Elektrophorese bei 5°C, 600 Volt max., 50 mA max. durchgeführt. Die Papierdochte können so wiederholt (für ca. 10 Elektrophoresen) verwendet werden.

b) Arbeitsgänge:

1. Polymerisationsküvette (mit Gel) kühlen (Kühlblock oder Kühlschranks ca. 15 min.)
2. Mit Messer- oder Spatelspitze vorsichtig Deckglasplatte (= Platte mit Slotformern) und U-förmige Dichtung abheben. Randständige Reste von nicht polymerisiertem Acrylamid mit Filterpapier abtupfen. Vor der Flektrophorese können SDS-Gele auch unter einer Polyäthylenfolie bei Raumtemperatur lagern, da die Gele innerhalb 24 Stunden noch nachpolymerisieren. Die Gele sollen jedoch innerhalb von 4 Tagen verarbeitet werden (max. 1 Woche).
3. Kühlblock mit ca. 1 ml Kerosin beschichten.
4. Das auf Folie polymerisierte Gel auf Kühlblock legen (Slotreihe auf die kathodennahe Seite).
5. Papierwicks mit den Kanten je 1 cm das Gel überlappend, parallel zu den Slots und parallel zueinander (exakt aufeinander) auf das Gel auflegen (Falten und Luftblasen zwischen den Kontaktflächen vermeiden!).

6. Um während des gesamten Laufes einen guten Kontakt zwischen Gel und Papierwicks zu gewährleisten, werden die Dochte vor Montage des Antikondensationsdeckels mit einer Glasplatte (3 mm) beschwert (s. a. Abb. 4).
7. Vorelektrophorese: 15 mA für 10 min.
8. Möglichst zügig Proben (je 4 μ l) in die Gelwannen einpipettieren.
9. 120 min. Elektrophorese bei 5°C Kühlblocktemperatur;
 $I_{\max} = 600$ Volt; $U_{\max} = 50$ mA; $P_{\max} = 30$ W.

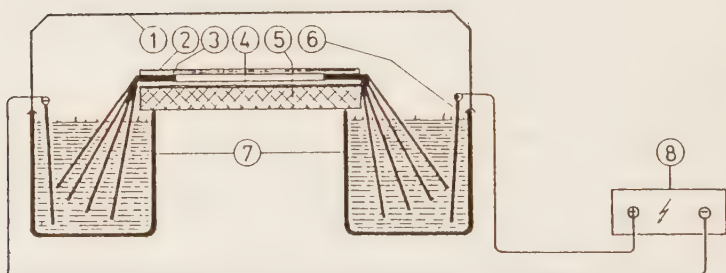


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Elektrophoresekammer:

- | | |
|---|------------------------|
| 1 | Stromversorgungsdeckel |
| 2 | Glasplatte |
| 3 | Papierwicks |
| 4 | Gel |
| 5 | Kühlblock |
| 6 | Elektroden |
| 7 | Elektrodenpuffertanks |
| 8 | Stromversorgung |

c) Visualisierung:

1. 30 min. in 200 ml. Trichloressigsäure (20 %ig) fixieren.
2. 1 min. waschen mit Entfärbelösung: Äthanol:H₂O:Eisessig (25:65:10). (1000 ml ansetzen!).
3. 45 min. färben in 0,2 % Coomassie-R-Brilliant Blue G 250 in frisch angesetzter Mischung aus Methanol:H₂O:Eisessig (45:45:10) insgesamt 200 ml, vor Gebrauch filtern und während des Färbevorganges schütteln.
6. 60 min. mit Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wird, entfärben.

d) Dokumentation:

Soll das Gel photographisch dokumentiert werden, empfiehlt es sich, dies vor dem Imprägnierungsschritt (s.u.) zu tun, da die Intensität der Banden und die Integrität des Gels unter den dazu erforderlichen Manipulationen leiden können.

1. Das Gel wird zum Photographieren direkt aus der Entfärbelösung glatt und blasenfrei auf einen Lichtkasten verbracht und zur späteren Identifizierung mit den entsprechenden Daten versehen. Die Aufnahmen erfolgen möglichst im abgedunkelten Raum (Spiegelungen!) unter Vorschaltung eines Orangefilters (Kodak Nr. 16 CAT 1495555). Zudem sollte der Lichtkasten um das Gel mit schwarzem Karton abgedeckt werden, um die Bildqualität nicht unnötig durch Streulicht zu beeinträchtigen.
2. Das ultradünne Gradientengel kann zur Archivierung auf einfache Weise präpariert werden, indem man es ca. 3 min. in Methanol:Glycerin:H₂O (70:27:3) imprägniert (200 ml ansetzen), auf eine Glasplatte legt, den ausgelappten Teil des Gels durch Betupfen mit 50%igem

Methanol auf Format bringt und mit Zellophan (3 min. in Imprägnierlösung getränkt) überzieht. Überstehende Kanten der Zellophanfolie werden auf die Unterseite der Glasplatte umgeschlagen und das Gel an der Luft oder im Trockenschrank getrocknet.

e) Molekulargewichtsbestimmung (SHAPIRO, VINUELA, MAIZEL)

Für die Erstellung der Eichkurve wurden die angegebenen Proteinmarker verwendet und die bekannten Molekulargewichte gegen die Wanderungsstrecke in cm aufgetragen. Das Molekulargewicht unbekannter Proteine kann nun anhand ihrer Wanderungsstrecke aus der Eichkurve entnommen werden. (Abb. 5)

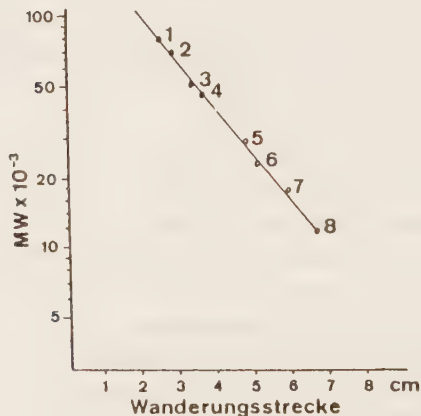


Abb. 5: (GÖRG, POSTEL, WESTERMEIER)

Eichkurve zur Ermittlung der Molekulargewichte:

1 Humantransferrin, 2 Humanalbumin, 3 γ-Globulin (schwere Kette), 4 Ovalbumin, 5 Carboanhydrase, 6 γ-Globulin (leichte Kette), 7 Pferdemyoglobin, 8 Cytochrom c.

f) **Markerproteinlösung:**

2 mg γ -Globulin und je 1 mg der anderen Markerproteine werden in 2,5 ml Probenpuffer gelöst. Kurz vor der Inkubation werden hierzu 100 μ l β -Merkaptoäthanol gegeben. Die Inkubation erfolgt bei 100°C für 3 min., danach läßt man die Lösung auf Raumtemperatur erkalten und gibt erneut 100 μ l β -Merkaptoäthanol (sowie 100 μ l Bromphenolblau) hinzu.

Anmerkung: Die günstigste Proteinkonzentration liegt zwischen 0,2 und 2 mg Protein/ml für gereinigte Proteine; Proteingemische erfordern erheblich höhere Konzentrationen (FEHRNSTRÄM, MOBERG)

4. Probenbereitung:

a) Probenentnahme

Die aus dem Magen entnommenen oder emetogen gewonnenen Fleischproben werden grob mit Wasser gesäubert, mit Papierhandtüchern getrocknet und präparativ von Fettgewebsanteilen befreit, sodann entweder eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

b) Homogenisierung und Inkubation

2 g der aufgetauten oder frischen Proben werden mit 10 ml 4%igem SDS-Probenpuffer versetzt und im Mörtel feinst verrieben. Die so 1:5 (w/v) verdünnte Probe wird durch dreiminütiges Kochen inkubiert und möglichst hoch zentrifugiert. Der klare Überstand wird abpipettiert und entweder eingefroren oder gleich weiter verarbeitet.

c) Acetonbehandlung

Um Verunreinigungen durch Fette, Kohlenhydrate u. a. zu entfernen, wird die Probenlösung mit Aceton (1 Tropfen konz. HCL auf 100 ml Aceton) im Verhältnis 9:1 (Aceton/Probenlösung) versetzt und über Nacht in verschlossenen Zentrifugengläsern (Explosionsgefahr!) im Eisfach inkubiert, anschließend zentrifugiert (1000 r.p.m. für 5 min.) und der Überstand verworfen. Der Proteinniederschlag (Pellet) wird erneut mit Probenpuffer versetzt und in Lösung gebracht (s. a. Abs. f).

d) Dialyse

Fast immer empfiehlt es sich native Proben oder Proben hoher Ionenstärke gegen eine 0,1% SDS enthaltende 0,01 M Phosphatpufferlösung zu dialysieren, da die Leitfähigkeit der Probenlösung deutlich unter der des Gels liegen soll (FEHRNSTRÖM). Der hierzu verwendete Dialyseschlauch wird in H₂O dest. bis zum Kochen erhitzt, mehrmals mit destilliertem Wasser gespült und bis zur Verwendung in 0,02%-igem NaN₃ bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die zentrifugierte Probe wird in das Schlauchstück gefüllt, dieses an beiden Enden verknötet und auf einem Magnetrührgerät 36 h im Becherglas dialysiert. Nach ca. 18 h wird gegen frische Pufferlösung ausgetauscht.

e) Filtration

Vorteilhaft ist weiterhin die Filtration (Whatman Nr. 1) der Probenlösung, da aus ungelösten Partikeln während der Elektrophorese kontinuierliche Proteine herausgelöst werden und zur Schlierenbildung führen können (FEHRNSTRÖM).

f) 1. Empirische Bestimmung der geeigneten Proteinkonzentration

Von 1 ml der so gewonnenen Proben werden nun entweder Verdünnungsreihen angelegt, wobei 100 µl Probe im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:5 und 1:7 mit Probenpuffer versetzt werden, oder die geeigneten Probenverdünnungen errechnet.

2. Rechnerische Bestimmung der geeigneten Proteinkonzentration

Um möglichst viele Proben gleichzeitig in einem Gel auftrennen zu können, wurde im Verlauf der Untersuchungen auf das Anlegen von Verdünnungsreihen verzichtet und stattdessen (nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Probe) aus Proteinkonzentration und der zu erwartenden Bandenanzahl die geeignete Verdünnung errechnet.

Hierzu wird der Reinigungsschritt mit Aceton (Abs. c) doppelt gefahren und je eine der Proben scharf zentrifugiert, der Überstand verworfen, das so gewonnene Pellet im Wärmeschrank (50°C, für 24 h) getrocknet und gewogen.

(Im Vergleich zu einer parallel vorgenommenen Gesamtproteinbestimmung nach LOWRY (s.Appendix) kann diese Methode einen Fehler von bis zu 25 % beinhalten. Der geringe zeitliche und apparative Aufwand und die Tatsache, daß heterologe Proteingemische mit unterschiedlicher Bandenanzahl und Proteinkonzentration pro Bande zu analysieren waren, lassen den Fehler jedoch vertretbar erscheinen.)

Die empirisch ermittelte Proteinkonzentration der Markerlösung, die eine optimale Bandenintensität und -scharfe ergibt, liegt bei ca. 3,2 mg/ml bzw. 0,4 mg/ml/Bande (in 2,5 ml Probenpuffer werden je 1 mg der 8 verschiedenen Markerproteine bzw. deren Untereinheiten gelöst).

Gl. 1:

$$\text{Proteinkonz.}/\text{Bande} = \frac{\text{Markerproteinkonz.}}{\text{Bandenanzahl}}$$

Die Menge der Probenlösung, die in 1 ml Probenpuffer enthalten sein muß, um pro erwarteter Bande eine ähnlich hohe Proteinkonzentration wie bei der Markerlösung zu erreichen, läßt sich durch Einsetzen der Gleichung 1 in die folgende errechnen:

Gl 2:

$$\text{Proteinkonz./Bande} = \frac{\text{Probenproteinkonz.}}{\text{erwartete Bandenanzahl}}$$

Anhand der mit Verdünnungsreihen durchgeführten Elektrophoresen ließen sich bei den zu analysierenden Proteidlösungen zwischen 10 und 20 Proteinfractionen nachweisen.

Beispiel:	Markerproteinkonz.	=	3,2 mg/ml
	Bandenanzahl	=	8
	Probenprot.konz.	=	40,0 mg/ml
	erw. Bandenanzahl	=	15
	Anteil Probenlösung an 1 ml	=	X

$$\frac{3,2 \text{ mg/ml}}{8} = \frac{X \text{ ml} \times 40 \text{ mg/ml}}{15}$$

$$\frac{15 \times 3,2 \text{ mg/ml}}{8 \times 40,0 \text{ mg/ml}} = X$$

$$0,15 = X$$

Die Probenlösung muß also im Verhältnis 15:85 mit Probenpuffer versetzt werden. (Die so ermittelten Verdünnungsverhältnisse finden sich in der Tabelle auf Seite 40.)

g) Inkubation mit β -Mercaptoäthanol

Sodann werden 4 % β -Mercaptoäthanol hinzugegeben und die Probe 3 min. bei 100°C im Schnappdeckelglas inkubiert. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur werden nochmals 4 % β -Mercaptoäthanol zugesetzt. Ist die Lösung dann trübe, wird sie bei 10°C abzentrifugiert.

Nun erfolgt das Einbringen der Proben in die Slots (4 μ l/Slot).

5. Charakteristika der verwendeten Protein-Proben:

Proben-Nr.	Art	Herkunft	Zube- reitung	Proteingehalt	Verdünnungs- verhältnis
MS 7	R	p.E.	b	21.5 mg/ml	28 : 72
MS 5	R	p.E.	b	26.5 mg/ml	23 : 77
GS 496	R	S.	?	61.0 mg/ml	10 : 90
GS 1593	R	S.	k	40.0 mg/ml	15 : 85
Rb	R	o.M.	b	53.5 mg/ml	11 : 89
Rk	R	o.M.	k	65.0 mg/ml	9 : 91
RbI	R	o.M.	b	54.0 mg/ml	11 : 89
RkI	R	o.M.	k	63.0 mg/ml	10 : 90
GS 780 B	R	S.	?	32.0 mg/ml	19 : 81
Sb	S	o.M.	b	54.0 mg/ml	11 : 89
Sk	S	o.M.	k	75.0 mg/ml	8 : 92
SbI	S	o.M.	b	45.0 mg/ml	13 : 78
SkI	S	o.M.	k	58.0 mg/ml	10 : 90
GS 373	S	S.	k	50.0 mg/ml	12 : 88
GS 1766	S	S.	k	74.0 mg/ml	8 : 92
MS 4	S	p.E.	b	27.5 mg/ml	22 : 78
MS 1	S	p.E.	b	44.0 mg/ml	14 : 86
GS 808	S	S.	k	40.0 mg/ml	15 : 85
GS 780 A	H	S.	?	58.0 mg/ml	10 : 90
GS 1743	H	S.	?	45.5 mg/ml	13 : 87
Ref 4	H	o.M.	k	27.0 mg/ml	22 : 78
MS 6	L	p.E.	k	53.5 mg/ml	11 : 89
GS 825	L	S.	?	52.0 mg/ml	11 : 89
Ref 1	L	o.M.	k	24.0 mg/ml	25 : 75
CB 1	L	p.E.	b	32.0 mg/ml	19 : 81
MAK	F	o.M.	k	30.0 mg/ml	20 : 80
SAR	F	o.M.	k	32.0 mg/ml	19 : 81
SCH	F	o.M.	k	54.0 mg/ml	11 : 89
WEI	F	o.M.	k	37.0 mg/ml	16 : 84
GS 1393	?	S.	?	51.5 mg/ml	12 : 88
GS 1460	?	S.	?	20.5 mg/ml	29 : 71
GS 1435	?	S.	?	32.0 mg/ml	19 : 81
GS 9	?	S.	?	16.0 mg/ml	38 : 62
GS 1482	?	S.	?	40.0 mg/ml	15 : 85
Maden				22.0 mg/ml	27 : 73

Abkürzungen:

Art: R=Rind; S=Schwein; H=Huhn; L=Lamm; F=Fisch; ?=Unbekannt;

Herkunft: p.E.=per Emesis; S=Sektion; o.M.=ohne Magenpassage;

Zubereitung: b=gebraten; k=gekocht; ?=Unbekannt;

Proben-Nr.	Art	Herkunft	Zube- reitung
------------	-----	----------	------------------

(bei den folgenden Proben
wurde nur mit Verdünnungs-
reihen ohne Proteinbestim-
mung gearbeitet)

GS 1351	?	S.	?
GS 1304	?	S.	?
GS 1874	?	S.	?
GS 1857	?	S.	?
GS 1891	?	S.	?
GS 1698	?	S.	?
GS 1496	S	S.	k
GS 1187	S	S.	?
GS 1434	S	S.	?
GS 1835	S	S.	?
GS 1972	?	S.	?
GS 101	?	S.	?
GS 825b	F	S.	?
Ref 2	S	o.M.	b
Ref 3	R	o.M.	b
MS 2	R	p.E.	b
MS 3	S	p.E.	b

Appendix:

a) Gesamtproteinbestimmung nach LOWRY

- Lösungen: I Natriumbicarbonat 2%-ig (w/v)
II Kaliumnatriumtartrat 2%-ig (w/v) (Merck 8087)
III Kupfersulphat 1%-ig (w/v) (Merck 2790)
IV 50 ml Lösung I
+ 1 ml Lösung II
+ 1 ml Lösung III
V Folinciocalteus (Merck 9001)
IV Lösung V+H₂O dest. im Verhältnis 1:1 (v/v)
VII Proteinstammlösung 10 mg Standardprotein (Humanalbumin, Serva 118855) gelöst in 10 ml SDS-Probenpuffer

Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve:

- 1 x 1000 µl SDS-Probenpuffer (Leerprobe)
4 x 10 µl Lösung VII + 990 µl SDS-Probenpuffer
4 x 20 µl Lösung VII + 980 µl SDS-Probenpuffer
4 x 30 µl Lösung VII + 970 µl SDS-Probenpuffer
usw. bis ca.
4 x 200 µl Lösung VII + 800 µl SDS-Probenpuffer

Zu jedem der Reagenzgläser wird 1 ml einer 20%-igen Trichloressigsäure (w/v) pipettiert, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 10–15 Minuten scharf zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes werden die Wände der Reagenzgläser vorsichtig abgetrocknet, ohne dabei das Sediment zu berühren. 100 µl 1n NaOH werden zum Sediment jedes Röhrchens pipettiert, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und 1 ml Reagenz IV unter Rühren bei Zimmertemperatur zugesetzt. Nach 10 Minuten 100 µl Reagenz VI beimischen und erneut 1/2 Stunde bei 37°C inkubieren.

Die Absorption der blauen Lösungen wird nun zur Erstellung der Eichkurve bei 725 nm (Beckmann Spectrophotometer, Model 25 Küvetten: OS 1.000 Silica 10 m/m) abgelesen, das arithmetische Mittel (aus den je 4 Proben gleicher Proteinkonzentration) errechnet und gegen die Konzentration aufgetragen.

Zur Gesamtproteinbestimmung der unbekannten Probe werden nun 100 µl SDS-Protein mit 900 µl SDS-Probenpuffer und 1 ml 20%-iger TCA bei 4°C über Nacht inkubiert, dann zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Reagenzglas wie oben angegeben abgetrocknet. Dem Sediment werden 100 µl 1-n-NaOH zupipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nun wird die Probe wie folgt aufgeteilt:

2 x 10 µl der Probe + je 90 µl 1n-NaOH

2 x 20 µl der Probe + je 80 µl 1n-NaOH

1 x Leerprobe (= 100 µl 1n-NaOH)

Es werden jedem Röhrchen 1 ml Lösung IV zupipettiert, gemischt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Reagenz IV und einer weiteren 1/2 Stunde bei 37°C kann die Absorption bei 725 nm gemessen und der Gesamtproteingehalt aus der Eichkurve abgelesen werden.

b) Troubleshooting Guide (GÖRG, POSTEL, WESTERMEIER, ergänzt)

Symptom	Ursache	Problemlösung
Gel polymerisiert im Mischgerät	hohe Raumtemperatur, ungenügende Entgasung, zu hohe Amoniumpersulfatkonzentration	Gradientenmischer vor Gebrauch kühlen; Entgasungszeit verlängern; Amoniumpersulfatkonzentration verringern
Proteinwanderung bleibt aus	Elektrodenpuffer gealtert (pH-Änderung)	Neuen Elektrodenpuffer ansetzen
Ungleichmäßige Proteinfront	Elektrodenkontakt insuffizient	Kontakt zwischen Papierwicks und Gel kontrollieren (Glasplatte)
	Gelgradient ungleichmäßig (Glasplatten nicht plan; Temperatur, etc.)	Küvette vor dem Gießen kühlen; Fehler beim Gießen (undichte Küvette etc.)
Schlierenbildung in den Proteinbanden	Gel unvollständig polymerisiert, Acrylamidgealtert	Amoniumpersulfatkonzentration erhöhen bzw. Lösungen frisch ansetzen
	Lufteinschlüsse im Gel	Gellösungen vor Gebrauch gründlich entgasen
	Slotformer defekt	scharfes Skalpell verwenden
	β -Merkaptoäthanol verdunstet oder oxidiert	β -Merkaptoäthanol erst kurz vor Gebrauch hinzufügen
	Probenpuffer gealtert	frischen Probenpuffer ansetzen
	Proteine nicht vollständig gelöst	Proben abzentrifugieren, filtern

Symptom	Ursache	Problemlösung
	zu hohe Proteinkonzentration	Fehlersuche bei der Proteinkonzentrations- errechnung eruieren bzw. Verdünnungsreihe erweitern
	Proteinfragmente durch Proteolyse?	
Keilförmiges, auf- gespreiztes Gel im Bereich der hohen Acrylamidkonzentration	Gel quillt ungleich als Folge des Gradienten	ausgelappten Teil des Gels nach dem Entfär- ben mit 50%igem Me- thanol behandeln

Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Geles hängen teils vom Polymerisationsgrad (= Kettenlänge) des Polyacrylamids und teils vom Vernetzungsgrad ab; d.h. von der Menge des eingebauten Vernetzers, NN-Methylenbisacrylamid.

Gewichtsverhältnisse von Acrylamid zu NN-Methylenbisacrylamid:

< 10:1 Gel wird brüchig, starr und trübe

> 100:1 5%ige Gele werden pappig und zerfallen leicht

30:1 ideale Konzentration, Gel ist elastisch und völlig transparent

(OHLFENSCHLÄGER)

F. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei ca. 600 Sektionen konnten 27 Fleischproben aus dem Mageninhalt Verstorbener asserviert werden. Nur bei 14 dieser Proben gelang es Dank polizeilicher Recherchen die Fleischsorte zu ermitteln. Es handelte sich dabei in 7 Fällen um Schweine-, in 3 Fällen um Rind-, in einem Fall um Hammelfleisch¹, in 2 Fällen um Geflügel² und in einem weiteren um Fisch.

GS-Proben, die schon makroskopisch als Wurstprodukt identifiziert werden konnten, wurden im Verlauf der Untersuchungen ausgesondert, da hier zusätzliche "Verunreinigungen" in Form von Milcheiweiß, Soja etc. und mögliche Fleischmischungen (z. B. Rind und Schwein) zu erwarten, oder zumindest nicht auszuschließen waren.

Als sichere Vergleichsproben wurden 3 Schweinefleisch-, 3 Rindfleisch-, 2 Hammelfleischproben und eine Geflügelprobe im Selbstversuch einetogen gewonnen.

Außerdem lagen zu jeder Fleischsorte mehrere Referenzproben unterschiedlicher Zubereitung, aber ohne Magenpassage vor.

Annähernd 60 verschiedene Proben (s. Tabelle S. 40) wurden so meist mehrfach nach dem angegebenen Verfahren processiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwertbaren der 23 am Institut für Rechtsmedizin, München, durchgeführten Elektrophoreseläufe waren vergleichbar und reproduzierbar und ließen sich durch mehrere, am Institut für Lebensmittelforschung in Weihenstephan durchgeführte Kontrolläufe verifizieren.

¹ Die Begriffe Hammel, Schaf und Lamm werden hier synonym verwendet.

² Unter Geflügel sind Huhn und Pute zusammengefaßt.

Dalton
x 10³

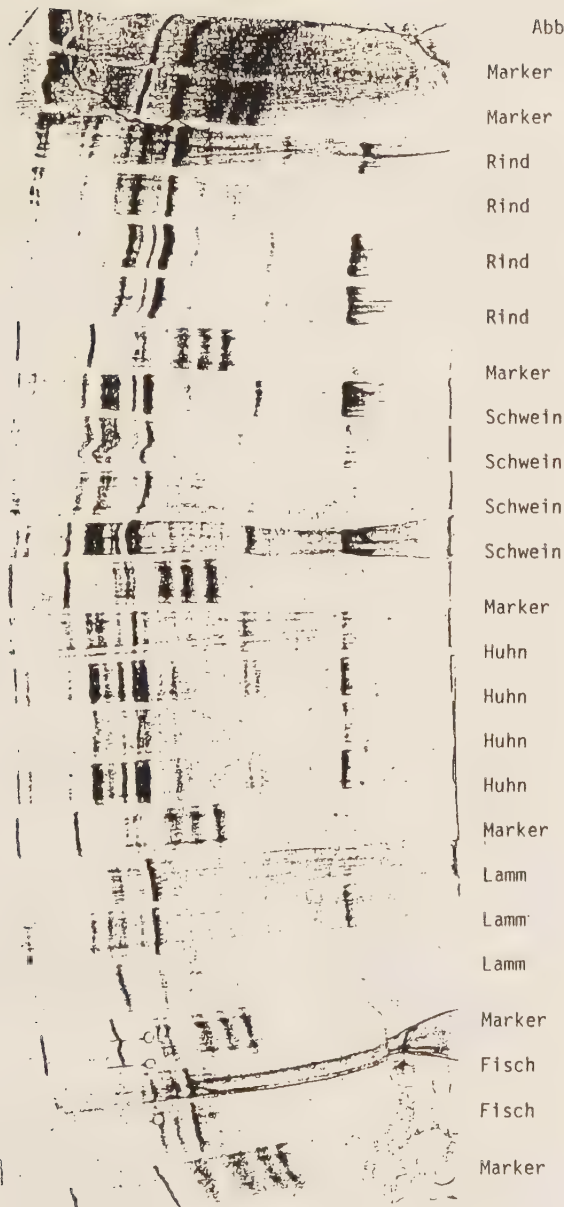
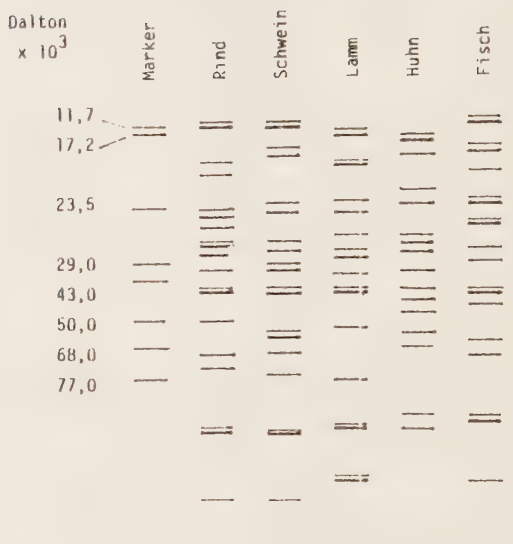


Abb. 7
(Schema)



Die Abbildung (Abb. 6) zeigt einen, wenn auch nicht optimalen, so doch repräsentativen Elektrophoreselauf, bei dem - neben den Markerproteinen - verschiedene Probenlösungen von Rinder-, Schaf-, Fisch- und Geflügelmuskelproteinen aufgetrennt wurden.

Prima vista enttäuscht vielleicht die Gleichförmigkeit der einzelnen Säulen. Bei genauerer Betrachtung lassen sich jedoch subtile Unterschiede herausarbeiten, wie dies bei schematischer Auftragung der einzelnen Banden deutlich wird (Abb. 7).

Das Schema wurde durch den Vergleich mehrerer Verdünnungsgrade und Elektrophoreseläufe erstellt. Bei den von der "idealen" abweichenden Proteinkonzentrationen ließen sich einerseits "überladene" Einzelbanden als kräftig ausgebildete Doppelbanden identifizieren; und andererseits, als Artefakt gedeutete Verschattungen durch höhere Proteinkonzentrierung als schwache, zusätzliche Bande erkennen.

Jede Einzelbande wurde auf Millimeterpapier übertragen, durch die Bandenprofile anderer bekannter Vertreter der gleichen Gattung ¹ (nach einer Maßstabentzerrung anhand der Markerproteinlaufstrecken) ergänzt und als Schablone zur Identifizierung unbekannter Gattungsgleicher im Bandenmuster herangezogen.

Durch Anlegen des so entstandenen gattungsspezifischen Bandenschemas lassen sich die einzelnen Proteinsäulen vergleichen und objektivieren.

Fleganter ist es, die so gewonnene Schablone oder auch die Proteinbanden auf Referenzgelen direkt auf Folien zu kopieren (hier müssen geeignete Photokopierer zum Einsatz kommen, um die zarten blauen Banden zur Abbildung zu bringen. Evtl. sind Vergrößerungen bzw. Verkleinerungen zur Maßstababgleichung vorzunehmen.) und eine Identifizierung durch zur-Deckung-bringen von Schablone und Bandensäule der unbekannten Probe vorzunehmen.

1 Zur Rekapitulation der Systematik im Tierreich (am Beispiel von *Bombus Lapidarius*)

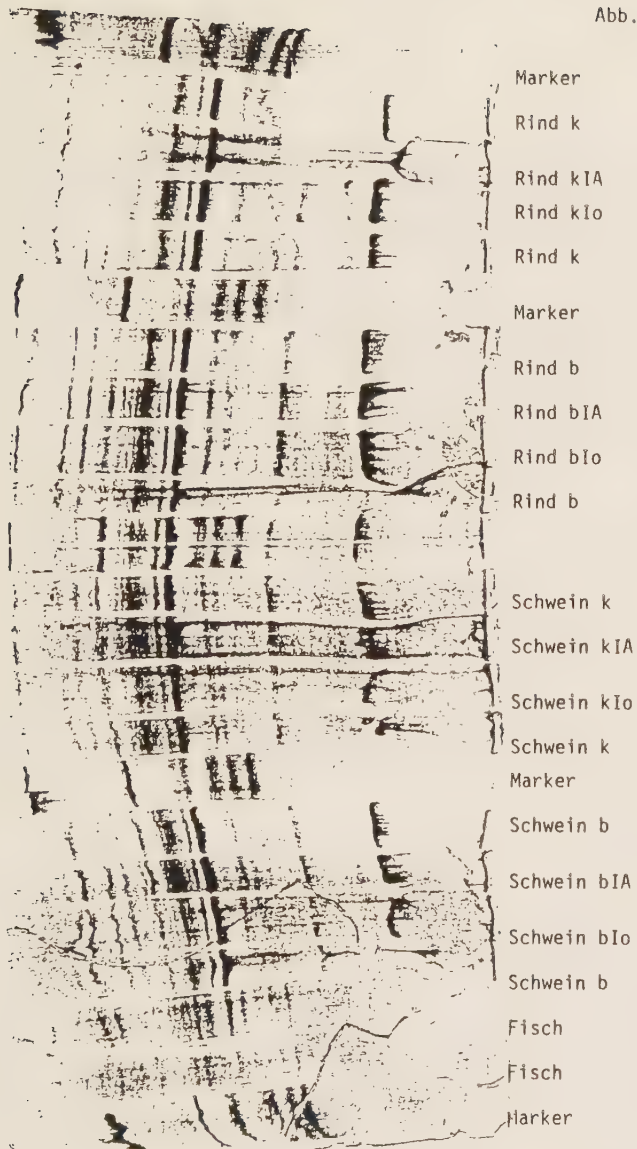
Stamm (phylum)	Gliederfüßer (arthropoda)
Klasse (classis)	Insekten (insecta)
Ordnung (ordo)	Hautflügler (hymenoptera)
Familie (familia)	Bienen (apidae)
Gattung (genus)	Hummel (bombus)
Art (spezies)	Steinhummel (b.lapidarius)

Der Einfluß verschiedener Parameter wurde im Elektrophoreselauf XVIII (Abb. 8) anhand unterschiedlicher Behandlung des gleichen Rohmaterials geprüft.

So wurde ein Teil einer Rohfleischprobe gekocht - der andere gebraten, um im Bandenmuster der Elektrophorese charakteristische Veränderungen/Unterschiede festzustellen.

Beim Braten wirken in der Regel hohe Oberflächentemperaturen (am Fleischstück) - die Temperaturverlaufskurve dürfte jedoch (in Abhängigkeit zur Expositionszeit) zum Kern hin annähernd exponentiell abfallen, so daß von 200°C bis 40°C (= nativ = "englisch") alle Temperaturbereiche angetroffen werden können. Abgesehen von einem schmalen Oberflächenbereich, in dem es zur Koagulation (bis Verkohlung) der Proteine kommt, wirken auf den überwiegenden Teil Temperaturen weit unter 100°C ein. Die Temperaturverlaufskurve beim Kochen hingegen ist durch das umgebende flüssige Medium und die generell wesentlich längere Exposition fast linear - die erreichte Kerntemperatur liegt kaum unter der der Oberfläche.

Extreme Einwirkzeiten (wie beim Kochen) führen zur Fragmentierung der Proteine, was die (im Vergleich zum Braten) geringgradig unschärferen Banden der gekochten Proben in der Elektrophorese erklärt.



k=gekocht; b=gebraten; A=mit Aceton behandelt; o=ohne Aceton-
behandlung; I=24h bei Zimmertemperatur inkubiert

Die im Vergleich zu emetogen gewonnenen Proben oder gar der Referenzproben (ohne MP) unschärferen Proteinbanden der GS-Proben waren auch durch 24-stündige Inkubation der Vergleichsproben an der Luft bei Zimmertemperatur (21°C) nicht reproduzierbar.

Das doch recht zeitaufwendige Dialyseverfahren wurde nach Vergleichsläufen mit nicht-dialysierten Proben verlassen, da (wohl aufgrund des günstigen Protein/Probenpufferquotienten gute Pufferung) die erwarteten Vorteile der Dialyse keine entscheidende Verbesserung von Trennschärfe und Konzentrierungsvermögen erbrachten.

Die Acetonbehandlung hingegen scheint neben der schnellen, labor-technisch einfachen (und für diese Belange ausreichend genauen) Gesamtproteinbestimmung auch in der Elektrophorese gewisse Vorteile zu haben. So divergiert die Proteinsäule im Bereich der höher konzentrierten Acrylamidphase des Gels nicht mehr.

Lediglich das Problem, die Trockensubstanz nach der Wägung wieder im Probenpuffer zu lösen, machte zusätzliche Aufwendungen erforderlich.

In sämtlichen Elektrophoreseläufen imponiert eine kräftige Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 44×10^3 Dalton. Sie ist bei allen der Vertebratenproteinproben deutlich ausgeprägt und kann bei der Auswertung als Referenzbande dienen. Bei kritischer Betrachtung erweist sie sich als inhomogen - eine verwischte bzw. überladene Doppelbande, wobei die zweite Proteinfraktion ein nur geringfügig höheres Molekulargewicht aufzuweisen scheint.

Längeres Lagern bzw. wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probenlösung führt zu einem "Alterungsprozess" der Proteine. Dies kann anhand der Markerproteine beobachtet werden (die Markerproteinstammlösung wurde unter gleichen Konditionen wie die Probenlösungen aufbewahrt, jedoch ungleich öfter aufgetaut und erneut eingefroren).

Es fällt dabei auf, daß nicht alle Proteine gleichermaßen anfällig sind: trotz gleicher Konzentration der einzelnen Proteine in der Starnmlösung ergeben besonders die Proteine im niedermolekularen Bereich - bei 23500 Dalton (= niedermolekulare Fraktion von γ -Globulin) und 17200 Dalton (= Pferdemyoglobin) - auch nach längerer Lagerung und physikalischer Beanspruchung noch scharfe Banden. Der Schluß liegt nahe, daß diese Proteine in besonderem Maße gegen chemische und physikalische Einflüsse inert sind. Eine zusätzliche Proteinbande taucht bei den Markern im MG-Bereich 18×10^3 Dalton auf - evtl. ein Spaltprodukt höhermolekularer Proteine.

Möglicherweise sind derartige Veränderungen der Proteine für das Zustandekommen der Inhomogenität im Bereich der "Referenzbande" bei 44×10^3 Dalton verantwortlich.

Deutlich demarkiert und von annähernd gleicher Intensität ist diese zweite Fraktion bei Geflügelproteinen. Sie ist hier dermaßen typisch, daß sie fast zur ad hoc-Identifizierung von Geflügelproteinen ausreicht. Als weitere Unterscheidungsmerkmale zu den Säuger- und Fischproteinbandenmustern fallen beim Geflügel in den MG-Bereichen um 80×10^3 und 100×10^3 Dalton sowie bei 16×10^3 und 17×10^3 Dalton je eine Proteinbande auf, die in ähnlicher Anordnung bei keinem anderen Vertebraten zu finden waren.

Fischproteine zeigen bei 44×10^3 Dalton eine den Mammlaren ähnliche Doppelbande, jedoch mit einer dritten Fraktion, die noch höhermolekular ist als die der zweiten Geflügelbande in diesem Bereich, und mit ca. 45×10^3 Dalton angenommen werden kann. Zwischen 24×10^3 und 29×10^3 Dalton weist Fisch - außer einer Doppelbande bei 25×10^3 und 29×10^3 Dalton - nicht den von Geflügel und Säuger bekannten Bandenreichtum auf.

Wichtig ist es, beim direkten Vergleich, außer dem Vorhandensein von Banden, auch deren Intensitäten (= Proteinkonzentration der Einzelbanden) und die dadurch entstehenden spezifischen Muster der Proteinsäulen zu beachten.

Während auf der Ebene der Tierklassen, zumindest bei den hier untersuchten (mammalia, aves und pisces), noch relativ gut unterschieden werden kann, wird es auf den Ebenen von Ordnung und Familie ungleich schwieriger Unterscheidungen zu treffen. Da hier nur aus der Klasse der Säugetiere ein größeres Kollektiv untersucht wurde, soll versucht werden, zwischen Rind, Schwein und Schaf zu differenzieren.

Bei guter Technik und optimalen Trennungsbedingungen scheint eine Unterscheidung möglich.

Während bei Rind und Hammel im Bereich von ca. 51×10^3 Dalton eine Bande zu finden ist, erscheint bei den Muskelproteinen des Schweines in diesem MG-Bereich noch eine weitere, höhermolekulare Fraktion, die eine gewisse Ähnlichkeit mit einer beim Geflügel hier vorkommenden Doppelbande aufweist.

(Auch zusätzliche Untersuchungen, wie isoelektrische Fokussierung oder 2-D-Elektrophoresetechniken, die am **Institut für Lebensmittel-forschung in Weihenstephan** durchgeführt wurden, konnten nicht zur Verbesserung der Ergebnisse beitragen).

Es zeigte sich, daß die zur Differenzierung der Säugerproteine relevanten Banden eher im höhermolekularen Bereich zu erwarten sind. Für zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet wäre es vielleicht sinnvoll, den Gradienten für diese Fraktionen ($MG\ 100 \times 10^3 \gg 43 \times 10^3$ Dalton) auszulegen und mit höheren Proteinkonzentrationen zu arbeiten. Auf diese Weise könnten die evolutionsbedingt geringen Unterschiede in der AS-Sequenz besser herausgearbeitet werden. Weiterhin sind Kombinationen mit anderen Detergenzien zu erwägen, die weitere Aminosäuren einbeziehen und dadurch die geringen Unterschiede in der Primärstruktur potenzieren könnten (GLAZER, PUTNAM).

Ebenso ist eine Verlängerung des Trennweges, d. h. der Laufstrecke im Gel zu erwägen, um geringe MG-Unterschiede besser herausarbeiten zu können.

Eine Gattungs- und Artzuordnung, wie es bei der zitierten Arbeit über Leguminosensamenproteine (GÖRG, POSTFL, WESTERMEIER) gelang, scheint jedoch unmöglich; und ist auch nicht zu erwarten, zumal schon intraindividuelle Unterschiede bei der Proteinverteilung in den Muskelgruppen einer Standardisierung bedürfen (z. B. Vergleich der Muskelproteine des Sternokleidomastoideus mit denen der Peronäusmuskulatur eines Individuums und schließlich deren Vergleich mit den korrespondierenden Muskelgruppen verschiedener Gattungen und Arten), wie sie zumindest in dieser Untersuchung nicht realisiert werden konnte.

G. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, daß auch physikalisch und chemisch denaturierte Muskelproteine durch entsprechend hochentwickelte Elektrophoresetechniken anhand ihrer spezifischen Proteinbandenmuster verglichen und identifiziert werden können.

Als Untersuchungsmaterial dienten aus dem Mageninhalt des Sektionsgutes gewonnene Fleischproben. Ergänzend und zum Vergleich wurden im Selbstversuch emetogen gewonnene Proben gesammelt, da hier entscheidende Parameter mit ausreichender Sicherheit bekannt waren.

Ein SDS-Elektrophoreseverfahren, bei dem als Trägermaterial ultradünne Polyacrylamidgele mit exponentiellem konkavem Gradienten zur Anwendung kamen, schien Dank hoher Nachweisempfindlichkeit (0,1 mg/Proteinbande) und guter Trennschärfe im Molekulargewichtsbereich zwischen 5.000 und 110.000 Dalton besonders geeignet.

Zwar konnte (schon aufgrund des zu kleinen Probenpools und geringer Spezifität des Materials) eine Gattungs- und Artspezifität der zur Auftrennung gelangten Proteine nicht nachgewiesen werden; immerhin gelang aber für den Stamm der Chordaten eine sichere Identifizierung über die Klasse hinaus.

Mit Einschränkungen kann, bei optimaler Labortechnik, eine Unterscheidung der denaturierten Muskelproteine in der Systematik bis zur Ordnungs- und Familienzugehörigkeit getroffen werden.

LITERATUR

Barker, W.C., Ketcham, L.K., Dayhoff, M.O.

Atlas of Protein-Sequence and Structure, Vol. 5 Supplement 3, NBR, (1978)

Belitz, H.D., Sechmüller, J.

Aminosäuren, Peptide, Proteine und andere Stickstoffverbindungen. In: Schormüller, J.: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. II, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967)

Bendall, J.R.,

Post-Mortem Changes in Muscle, Ed. Bourne, G.H., The Structure and Funktion of Muscle, Vol. 3, Acad. Press N.Y., 227 ff, (1960)

Colvin, J.R.

Denaturation a requiem. In: H.W. Schulz and Anglemier, A.F. (eds.), Proteins and Their Reactions. Avi Publishing Co. Inc., Westport, Conn., 69, (1964)

Cooke, R

Control of gastric emptying and motility. Gastroenterology 68, 804-816, (1975)

Cooperman, A.M., Cook, S.A.

Gastric Emptying - Physiology and Measurement. Surgical Clinics of North America, Vol. 56, No. 6, 1277-1287, (1976)

Davenport, H.W.

Physiology of the Digestive Tract. Chicago Year Book Med. Publ. 13, (1971)

Engelhardt, V.A.

Adenosine triphosphatase properties of myosin. Advance. Enzymol. 6, 147, (1946)

Fehrström, H., Moberg, U.

SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. LKB Application Note 306, Bromma, (1977)

Fergusson, K.A.

Metabolism. 13, 985, (1964)

Fruton, J.S.

Pepsin, ed. Bayer: PD. The Enzyms, Acad. Press, New York and London, 119-163 (1971)

Gasparic, V., Bjellqvist, B., Rosengren, A.

LKB-Producter, Bromma, Sweden, Swedish patent 75 140 49-1 (1975), U.S. patent 4 130 470 (1978), Deutsches Patent 2656 162 (1981)

Glazer, A.N., De Lange, R.J., Sigman, D.S.

Chemical Modification of Proteins, Selected Methods and Analytical Procedures, North Holland/American Elsevier. 68-120, (1975)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultrathin-Layer Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gels on Cellophane. Anal. Biochem. 89, 60-70, (1978)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen. Elektrophorese forum, München, 91-96 (1978)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultradünnschicht isoelektrosche Fokussierung in 0,12 mm Polyacrylamid-Gelen auf Polyesterfolie. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 168, 25-28, (1979)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgel auf Folie. GiT Labor Medizin 1, 32-40, (1979)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultrathin-Layer Horizontal Electrophoresis, Isoelectric Focusing and Protein Mapping in Polyacrylamide Gels on Cellophane. In: Electrophoresis '79, Radola ed., Walter de Gruyter Berlin, 67-78 (1980)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultrathin-Layer protein Mapping Combining Horizontal Focusing and Horizontal Electrophoresis in Ultrathin-Layer Polyacrylamide Gels on Foils. Science Tools 27, 14-18, (1980)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, F., Righetti, P.G.

Gel Gradient Electrophoresis, isoelectric focusing, and Two-Dimensional Techniques in Horizontal, Ultrathin Polyacrylamide Layers. J. Biochem. Biophys. Methods 3, 273-284 (1980)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultradünnschicht - Zweidimensionale Elektrophorese. Elektrophorese Forum, München, 106-111 (1980)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, F., Righetti, P.G.

SDS-Gel Gradient Electrophoresis, isoelectric Focusing, and High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis in Horizontal Ultrathin-Layer Polyacrylamide Gels. In: Electrophoresis '81, (Allen, Arnauds eds.) Walter de Gruyter Berlin, 257-270 (1981)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Weser, J.

Genetic studies with isoelectric focusing in ultranarrow immobilized pH gradients. Science Tools 29, 23-24 (1982)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

SDS-Electrophoresis of Legume Seed Proteins in Horizontal Ultrathin-Layer Pore Gradient Gels. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 174, 282-285 (1982)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Righetti, P.G., Ek, K.

One and Two Dimensional Electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels. LKB Application Note Nr. 320, Bromma (1981)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Bjellqvist, B., Ek, K., Gianazza, E., Righetti, P.G.

Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients. III. Application to Two-Dimensional Separations. In: Electrophoresis '82 (Stathakos ed.) Walter de Gruyter, Berlin, 353-361 (1982)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Ultrathin-Layer Horizontal High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Legume Seed Proteins with Intermediate Protein Staining. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 174, 286-289 (1982)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Günther, E.

Ultrathin-Layer Isoelectric Focusing, electrophoresis and protein Mapping of Must and Wine Proteins. In: Recent Developments in Food Analysis (Baltes ed.), Verlag Chemie Weinheim, 265-269 (1982)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R.

Isoelektrische Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten und ihre Anwendung für die 2D-Elektrophorese. Elektrophorese Forum, München, 35-39 (1982)

Görg, A., Postel, W., Weser, J., Weidinger, S., Patutschnick, W., Cleve, H.

Isoelectric focusing in immobilized pH gradients for the determination of the genetic Pi (Alpha₁-antitrypsin) variants. Electrophoresis 4, 153-157 (1983)

Görg, A., Postel, W., Weser, J., Westermeier, R.

Urinprotein-Differenzierung mit SDS-Elektrophorese in horizontalen ultradünnen Polyacrylamid-Gradienten-Gelen. LKB Informationsschrift, München (1983)

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Bjellqvist, B., Ek, K., Gianazza, E., Righetti, P.G.

Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients. III. Application to Two-Dimensional separations. In: Prot. Biol. Fluids 30, 607-610 (1983)

Görg, A., Weser, J., Westermeier, R., Postel, W., Weidinger, S., Patutschnik, W., Cleve, H.

Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin (Tf) subtypes and variants. Human Genet. (1983), im Druck

Hamm, R.

Heating of Muscle Systems. In: The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, Ed. by Briskey, F.J., Cassens, R.G. and Trautmann, J.C., Madison: University of Wisconsin Press, 363-385 (1966)

Hashimoto, Y., Fukazawa, T., Niki, R., Kanazawa, H., Yasui, T.

Denaturation of myosin A. Jap. J. Zootech. Sci. 30, 318, (1959)

Hopkins, A.

The pattern of gastric emptying: a new view of old results. Journal of Physiology 182, 144-149, (1966)

Hunt, J.N., Spurrell, W.R.

The pattern of emptying of the human stomach. J. Physiol. (Brit.) 113, 157, (1951)

Hunt, J.N., McDonald, J.

The Influence of Volume on Gastric Emptying. J. Physiol. (London) 126, 459, (1954)

Joly, M.

A physico-chemical approach to the denaturation of proteins, London, New York: Acad. Press (1965)

Karlson, P.

Lehrbuch der Biochemie, 10. Auflage, Thieme Verlag, 40, 48; (1977)

Kauzmann, W.

Structural factors in protein denaturation. J. Cell. Comp. Physiol. 47 (suppl.): U3 (1956)

Krammer, K

Arbeitsbuch Physiologie: Bd. 2. Vegetative Physiologie: II (1980)

Lapange, S.

Physico-chemical aspects of protein denaturation, New York: Wiley 222-223 (1978)

Lawrie, R.A.

Fleischkunde; BLV-Verlagsgesellschaft München, Basel, Wien (1970)

Luyet, B.J.

Behavior of Muscle Subjective to Freezing and Thawing. In: The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food, Ed. by Briskey, F.J., Cassens, R.G. and Trautmann, J.C., Madison: University of Wisconsin Press, 353-362 (1966)

Magee, D.F.

Gastrointestinal Physiology, Ed. Thomas, C.C. (1962)

Margolis, J., Kenrick, K.G.

Nature 214, 1334 (1967)

Noll, H.

Polysomes: Analysis of Structure and Function; Techniques in biosyntheses; Eds. Campbell, P.N., Sargent, J.R., Acad. Press, London, 101-180, (1969)

Nanninga, L.B.

The effect of heating on the kinetic constants of myosin ATPase. *Nature* 194, 187 (1962)

Neurath, H. Greenstein, J.P., Putnam, F.W., Erickson, J.O.

Chem. Revs. 34, 157 (1944)

Ohlenschläger, Berger, Depner

Synopsis der Elektrophoresetechniken. G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt (1980)

Putnam, F.W.

The Interaction of Proteins and Synthetic Detergents, *Advance in protein Chemistry*, Vol. 4, 79 (1948)

Righetti, P.G., Gianazza, F., Bjellqvist, B., Ek, K., Görg, A., Westermeier, R.

Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients. II. Application to hemoglobin Analysis. In: *Electrophoresis '82* (Stathakos ed.) Walter de Gruyter, Berlin (1982)

Righetti, P.G.

Isoelectric focusing; Theory, methodology and some applications. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier Biochemical (1983)

Righetti, P.G., Gianazza, F., Bjellqvist, B., Ek, K., Görg, A., Westermeier, R.

Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients. II. Application to Hemoglobin Analysis. In: *Prot. Biol. Fluids* 30, 603-606 (1983)

Schmidt, R.F.

Physiologie des Menschen. 21. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1983)

Schut, J.

Food Emulsions, Ed. Stig Fridberg, The Swedish institute for Surface Chemistry, Stockholm, Sweden; Marcel Dekker Luc., 385-453 (1976)

Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, Jr.

Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. Biochem. Biophys. Res. Commun 28, 185 (1967)

Silbernagel, S., Despopoulos, A.

Atlas der Physiologie, dtv, 32, 33, 194 (1979)

Trautmann, J.C.

Role of Muscle as a Food, Ed. by Briskey, F.J., Cassens, R.G. and Trautmann, J.C., Madison: University of Wisconsin Press, 403-418 (1966)

Ugolev, A.M.

Physiology and Pathology of Membrane Digestion, Plenum Press, N.Y., 17-22 (1968)

Uhlenhut, P.

Über die Entwicklung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 39, 309 (1948)

Westermeier, R., Postel, W., Telek, L., Görg, A.

Isoelectric Focusing, SDS Gel Gradient Electrophoresis and 2D-Electrophoresis of Tropical and European Legume Proteins in Ultrathin Polyacrylamide Layers. In: Electrophoresis '81, Walter de Gruyter, Berlin, 281-288 (1981)

Westermeier, R., Postel, W., Görg, A.

Elektrophorese, Stand und Trends elektrophoretischer Trennverfahren. LABO 13 (10), 1159 (1982)

LEBENS LAUF

Name: Schröter
Vorname: Michael
Wohnort: 8000 München 21, Reutterstraße 24
Geboren am: 14.11.1950 in Solingen
Vater: Herbert A.O. Schröter, Handelskaufmann
Mutter: Ute D. Schröter, geb. Jäger
Staatsangehörigkeit: deutsch, ehem. schweizer
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig

- 1957 - Einschulung an der Volksschule Penzing bei Landsberg/Lech
- 1963 - Eintritt in das Dominikus-Zimmermann-Gymnasium in Landsberg
- 1974 - Abitur am Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig
- 1974 - Aufnahme des Studiums der Physik an der LMU München
- 1978 - Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der LMU Würzburg
- 1980 - Ärztliche Vorprüfung
- 1981 - Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1981 - Wechsel an die LMU München
- 1983 - Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1984 - Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 06.11.1984
- 1985 - Erwerb der deutschen Staatsangehörigkeit am 25.01.1985
- Erteilung der Approbation als Arzt am 07.02.1985
- Seit dem 01.09.1985 Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Abteilung am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München

